

physikalische Wirkungen bei der Technik der Aufarbeitung zurückzuführen sein könnte<sup>2)</sup>. Diese ungewöhnlich schnelle scheinbare Induktion einer Fermentaktivität durch veränderte Milieubedingungen veranlaßte uns, Untersuchungen zum Mechanismus der Reaktion durchzuführen.

Wir verwendeten für diese Untersuchung Zellen des Ehrlichschen Mäuse-Ascites-Carcinoms, des Yoshida-Sarkoms und des Walker-Carcinoms in Ascitesform. Durch die subcutane Injektion kommen Asciteszellen unter einen bestimmten Gewebedruck und sind bereits nach wenigen Minuten ohne Zwischenraum aneinander gelagert. Um die angehäuften Zellen herum findet sich histologisch ein optisch leerer Raum bzw. auseinandergedrängtes Bindegewebe, in dem vermutlich das Ascitesserum enthalten ist. Um zu prüfen, wie weit diese Bedingungen zum Auftreten der positiven LDH-Reaktion führen, wurden in einer Versuchsreihe subcutan implantierte Zellen durch Eröffnung der Injektionshöhle gewonnen und nativ auf ihre histochemische LDH-Aktivität untersucht. Dabei ergab sich ein erheblicher Anstieg der nachweisbaren Aktivität bei je 1000 gezählten Zellen von 5 bis 15% im Ausgangsascites auf etwa 30 bis 60% nach subcutaner Injektion.

Die histochemische Untersuchung subcutan implantierter Ascites-Tumorzellen erfolgt an Kryostatschnitten, während Ascites-Tumorzellen nativ, ohne Einfrieren, untersucht werden. Deshalb wurde der Einfluß des Gefriervorganges auf den Ausfall der histochemischen Reaktion geprüft. Es ergab sich, daß bei entsprechend eingefrorenen Ascites-Tumorzellen ebenfalls ein Anstieg der histochemisch nachweisbaren LDH-Aktivität hinsichtlich der Zahl der positiven Zellen und der Intensität der Reaktion eintritt. Dabei ist die Zeitdauer der Aufbewahrung im gefrorenen Zustand und die Zeit des Auftauens von entscheidender Bedeutung. Objektive Werte für die Intensität der Farbreaktion lassen sich bei Vorliegen unterschiedlich stark reagierender Zellen nach einem Vorgehen von ZIMMERMANN und PLATT<sup>3)</sup> durch Elution des Farbstoffes mit Pyridin und photometrische Bestimmung der Intensität gewinnen. Dabei ergibt sich, daß 30 min eingefrorener Tumorascites ( $-20^{\circ}$ ) den doppelten Extinktionswert aufweist wie nativ untersuchte Zellen. Durch die unterschiedlich lange Schnittherstellung ergibt sich demnach ein nicht genau bestimmbarer methodischer Fehler. Bemerkenswert ist dabei, daß die parallel durchgeführte biochemische Untersuchung der LDH-Aktivität an den Tumorzellen keinen signifikant abweichenden Wert bei eingefrorenen gegenüber nativen Zellen ergibt. Diese Aussage gilt mit allen Vorbehalten, die hinsichtlich des LDH-Nachweises an Zellen gemacht werden müssen.

Der kausale Mechanismus, der für den Anstieg des LDH-Nachweises nach Einfrieren bestimmend sein dürfte, ist vermutlich ein Membraneffekt. Möglicherweise wird durch gesteigerte Membrandurchlässigkeit das Eindringen der Reaktionslösung zunehmend ermöglicht, so daß sowohl die Zahl positiver Zellen als auch die Reaktionsintensität zunimmt. Auch physikalische Wirkungen am Cytoplasma bzw. den Mitochondrien können hierbei eine Rolle spielen.

Diese Befunde ergeben, daß das rasche Auftreten histochemisch nachweisbarer Fermentaktivitäten in vorher inaktiven Ascites-Tumorzellen einen Summationseffekt darstellt, der auf das veränderte biologische Milieu und auf physikalische Faktoren der technischen Aufbereitung zurückzuführen ist.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

*Pathologisches Institut der Universität, München*

M. EDER und H. WRBA

Eingegangen am 25. April 1962

<sup>1)</sup> EDER, M., A. SCHAUER u. H. WRBA: *Naturwissenschaften* 47, 475 (1960). — <sup>2)</sup> EDER, M., u. H. WRBA: *Z. Krebsforsch.* 64, 353 (1961). — <sup>3)</sup> ZIMMERMANN, H., u. D. PLATT: *Histochemie* 2, 125 (1960).

#### Induktion von Zelldifferenzierung und Fermentaktivität bei der Umwandlung von Ascites-Tumoren in solide Geschwülste

Kurze Zeit nach subcutaner Injektion von Ascites-Geschwülsten bei Versuchstieren ergeben sich auffällige ferment-histochemische und morphologische Umdifferenzierungen in der entstehenden soliden Geschwulst, deren biologische Bedeutung nicht geklärt ist<sup>1)</sup>, <sup>2)</sup>. Schon 1 bis 4 Std nach der Transplantation findet sich im histologischen Schnitt eine deutliche Trennung der zusammengelagerten Geschwulstzellen in eine Außenzone und eine Innenschicht. Die gleichbleibende Schichtdicke in der Außenzone legt für dieses Phänomen als

*Naturwissenschaften* 1962

Erklärung eine Milieuwirkung im Sinne der sog. „Grenzschichtdicke“ nahe. Wir haben versucht, durch verschiedenartige Mechanismen ähnliche Wirkungen in zusammengelagerten Ascites-Tumorzellen auszulösen.

Die Ursache für die Schichtbildung konnte in physikalischen Faktoren (Gewebdruck) und in biochemischen Wirkungen der Umgebung zu suchen sein. Die ab 1 Std nach der Transplantation nachweisbare Schichtung geht mit der Ausbildung einer großzelligen Außenzone und einer kleinzelligen Innenzone einher, wobei die Außenzone unabhängig von der Größe der implantierten Geschwulstmengen immer die gleiche Schichtdicke aufweist. Die Begrenzung dieser beiden Schichten ist scharf, so daß kein stufenweiser Übergang in Abhängigkeit eines Konzentrationsgradienten diffundierender Stoffe vorliegt. Die Differenzierung in zwei Zellarten ist in jeder Färbung deutlich. Fermentreaktionen ergeben regelmäßig scharf abgegrenzte Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität in der Außenzone und positive Succinodehydrogenasereaktion in der Innenzone<sup>2)</sup>.

Überschichtung derartiger Zellen mit verschiedenen üblichen Nährlösungen der Gewebekultur führt nach mehrstündiger Aufbewahrung im Brutschrank nicht zum Auftreten morphologisch oder fermenthistochemisch nachweisbarer Schichtungen.

Die subcutane Implantation gleichartiger, mit Asciteszellen gefüllter Röhrchen ergibt dagegen in der Kontaktzone am offenen Röhrchenende eine Schichtung, die der subcutan implantierten Ascitestumorzelle vergleichbar ist. Dieser Befund weist auf die Wirkung eines vom Trägerorganismus stammenden Faktors hin. Ein weiterer Hinweis in dieser Richtung findet sich an Ascitestumorzellen, die sedimentiert und in Celloidinschälchen eingefüllt implantiert wurden. Auch hier entsteht an der offenen Seite der Schälchen eine ähnliche Außenzone.

Es liegt nahe, die zentralen Anteile des Implantates auf Grund der morphologischen Veränderungen als Bereich anzusehen, in welchem es zu regressiven Veränderungen und zur Nekrose der Zellen kommt, obwohl der weitere Verlauf der Entwicklung der soliden Geschwulst gegen diese Deutung spricht. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden subcutan implantierte Ascites-Tumorzellen nach 24 Std, d.h. zu dem Zeitpunkt, in dem die Schichtung sehr deutlich vorliegt, operativ entnommen und nach Spaltung des Präparates beim gleichen Tier oder einem anderen Tier der gleichen Art subcutan implantiert. Die dadurch nach außen gebrachten LDH-negativen Zellen der Innenzone erweisen sich nach weiteren 24 Std in der neu entstandenen Randzone als LDH-positiv. Das bedeutet, daß Zellen des zentralen Anteiles zu diesem Zeitpunkt mit Sicherheit vital und noch umdifferenzierungsfähig sind.

Bestimmungen der Kerngrößen der LDH-positiven Außenzone und der succinodehydrogenasepositiven Innenzone ergeben mit hoher statistischer Signifikanz, daß es sich um verschiedene Kernpopulationen handelt.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

*Pathologisches Institut der Universität, München*

H. WRBA und M. EDER

Eingegangen am 25. April 1962

<sup>1)</sup> EDER, M., H. WRBA, H. VERSMOLD u. A. SCHAUER: *Naturwissenschaften* 48, 481 (1961). — <sup>2)</sup> EDER, M., u. H. WRBA: *Z. Krebsforsch.* 64, 353 (1961).

#### Staminate Flower Formation on Gynoecious Cucumbers as Influenced by the Various Gibberellins

One of the most striking examples of specificity among the gibberellins is with the cucumber. The authors<sup>1)</sup>, in a comparison of biological activities of gibberellins A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> and A<sub>4</sub>, reported that gibberellin A<sub>4</sub> was more effective than A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> or A<sub>3</sub> in promoting hypocotyl elongation in this species. This was a departure from the usual response pattern where gibberellin A<sub>3</sub> was found most effective for stem elongation of other species. Our findings have subsequently been confirmed<sup>2)</sup>.

Since these early studies were performed, five more gibberellins have been identified<sup>3)</sup>. These, in turn, have been subjected to a number of bioassays. BRIAN<sup>4)</sup> reported that gibberellins A<sub>7</sub> and A<sub>9</sub> were as active as A<sub>4</sub> in promoting hypocotyl elongation of cucumber seedlings. Our data<sup>5)</sup> support those of BRIAN.

Gibberellin also modifies flower sex expression in the cucumber. Pistillate flower formation is delayed<sup>6)</sup> and staminate flower formation enhanced<sup>7)</sup>. Gibberellin A<sub>3</sub> has been found effective for induction of staminate flowers on gynoecious genotypes that produce exclusively pistillate flowers<sup>8)</sup>. An earlier study<sup>9)</sup> with gibberellins A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> and A<sub>4</sub> indicated that gibberellin A<sub>4</sub> not only stimulated greater vegetative elongation in monoecious and gynoecious cucumber seedlings, but was also more effective than the other three for induction of staminate flowers.

Table. Staminate flower formation on gynoecious cucumbers induced by the various gibberellins

Gibb. a)	I <sup>b)</sup>	II	III	Gibb.	I	II	III
A <sub>7</sub>	10	9.2a	6.2a	A <sub>1</sub>	8	2.4	d
A <sub>3</sub>	10	7.4 b	5.5a	A <sub>6</sub>	8	1.9	de
A <sub>4</sub>	10	6.9 b	4.0 b	A <sub>5</sub>	7	1.7	de
A <sub>9</sub>	10	4.9 c	3.6 b	A <sub>8</sub>	3	0.6	e
A <sub>2</sub>	10	3.3 c	2.3 c	Ctrl. a)	0	0.0	

a) Gibb. = Gibberellin; Ctrl. = control (no gibberellin). — b) I = Number of plants with staminate flowers; II = number of staminate flowers per plant; III = number of nodes per plant with staminate flowers. All values based on a total of 10 plants per gibberellin treatment and the first 20 nodes of each plant. Ten microliters of each gibberellin at a concentration of  $3 \times 10^{-3}$  Molar applied to the emerging first true leaf and the treatment repeated after seven days. Within a column, means followed by different letters are significantly different at the 5% level [see DUNCAN, D.B.: Biometrics 11, 1—42 (1955)].

In the present study comparable quantities of the nine known gibberellins (Table) were applied to the first emerging true leaf of the gynoecious cucumber MSU 743—5<sup>10)</sup>, and the treatment repeated after 7 days. The number of plants that produced staminate flowers, the number of staminate flowers per plant, and the number of nodes producing staminate flowers are listed in the Table. These criteria for staminate flower formation suggest the order of activity indicated, with gibberellin A<sub>7</sub> the most active and A<sub>8</sub> the least effective. All plants produced staminate flowers that were treated with gibberellins A<sub>7</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>9</sub>, or A<sub>3</sub>.

Gibberellin A<sub>7</sub> was most active followed by A<sub>4</sub>, A<sub>2</sub> and A<sub>9</sub> for numbers of staminate flowers per plant, and nodes producing staminate flowers. In these flowering responses, gibberellins A<sub>7</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>2</sub> and A<sub>9</sub> were significantly more effective than the other gibberellins. This order of biological activity was similar to but slightly divergent from that for cucumber hypocotyl elongation<sup>4), 5)</sup>.

Structural similarities of gibberellins A<sub>2</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>7</sub> and A<sub>9</sub> have been described by CROSS et al.<sup>3)</sup>. The absence of the C/D hydroxyl group is common to all. With the possible exception of gibberellin A<sub>3</sub>, all other related gibberellins with a C/D hydroxyl were significantly less active than gibberellins A<sub>7</sub>, A<sub>4</sub>, A<sub>2</sub> and A<sub>9</sub>. This suggests a possible relationship between chemical structure and the enhancement of staminate flower expression in the gynoecious cucumber plant.

Department of Horticulture, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA

S. H. WITTEW and M. J. BUKOVAC

Eingegangen am 26. März 1962

<sup>1)</sup> BUKOVAC, M. J., and S. H. WITTEW: Plant Growth Regulation (R. M. KLEIN, edit.), p. 505. Ames, Iowa: Iowa State Univ. Press 1961. — <sup>2)</sup> HALEVY, A. H., and H. M. CATHEY: Bot. Gaz. 122, 63 (1960). — LOCKHART, J. A., and P. H. DEAL: Naturwissenschaften 47, 141 (1960). — <sup>3)</sup> CROSS, B. E., J. F. GROVE, P. McCLOSKEY, J. MACMILLAN, J. S. MOFFATT and T. P. C. MULHOLLAND: Adv. Chem. Ser. 28, 3 (1961). — MACMILLAN, J., J. C. SEATON and P. J. SUTER: Adv. Chem. Ser. 28, 13 (1961). — <sup>4)</sup> BRIAN, P. W.: Nature [London] 189, 74 (1961). — <sup>5)</sup> WITTEW, S. H., and M. J. BUKOVAC: Amer. J. Bot. (in Press, 1962). — <sup>6)</sup> WITTEW, S. H., and M. J. BUKOVAC: Michigan Agric. Exp. Stat. Quart. Bul. 40, 352 (1957). — <sup>7)</sup> WITTEW, S. H., and M. J. BUKOVAC: Econ. Botany 12, 213 (1958). — <sup>8)</sup> PETERSON, C. E., and L. D. ANHDER: Science 131, 1673 (1960). — <sup>9)</sup> BUKOVAC, M. J., and S. H. WITTEW: Adv. Chem. Ser. 28, 80 (1961). — <sup>10)</sup> PETERSON, C. E.: Michigan Agric. Exp. Stat. Quart. Bul. 43, 40 (1960).

Journal article number 2955 of the Michigan Agricultural Experiment Station.

### Unterschiedliche Wirksamkeit der Gibberellinsäure auf Einzelvorgänge der photoperiodisch induzierten Wachstumsreaktionen von Vitis vinifera L.

Bei vielen Holzpflanzen wird das Triebängenwachstum durch Kurztag gehemmt. Hierbei erfolgt sowohl eine Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit, also eine Hemmung der Internodienstreckung und der Blattfaltung, als auch die Bildung einer ruhenden Terminalknospe oder — wie bei Reben — von ruhenden Axillarien. Verschiedentlich wurde bereits auf die Möglichkeit hingewiesen<sup>1)</sup>, daß das Nachlassen der Wuchsgeschwindigkeit und die Anlage von Ruheknospen nicht als zeitliche Stadien eines gleichen, durch Kurztag induzierten Vorganges aufzufassen sind. Vielmehr wird an Stelle einer Folgereaktion an unabhängig ablaufende Prozesse gedacht. Allerdings war es bislang nicht möglich, diese Vorstellung durch experimentelle Befunde eindeutig zu belegen.

Hinweise für die unabhängige Steuerung beider Komponenten der Wachstumsperiodizität lieferten Beobachtungen an Reben über den Einfluß von Gibberellin auf das photoperiodische Reaktionsvermögen<sup>2)</sup>. So war unter anderem festzustellen, daß die durch Kurztag (Tageslänge 10 bis 13 Std) induzierte Wachshemmung bei *V. vinifera*-Sorten durch gleichzeitige und kontinuierliche Applikation von Gibberellinsäure (GS) annulliert wurde. Dennoch wird aber die durch Kurztag hervorgerufene Austriebsverlangsamung im Folgejahr nicht durch GS-Vorbehandlung beeinflußt (Tabelle 1). Ein analoges

Tabelle 1. Einfluß einer Tageslängen- und Gibberellinvorbehandlung auf den Austrieb der Winterknospen nach der Winterruhe<sup>a)</sup>

	1959			1960		
	Tageslänge	GS	Wuchslänge cm	Austrieb <sup>b)</sup> in Tagen	Diff.	Knospen % <sup>c)</sup>
Riesling	normal	—	40,4 ± 3,6	12,7 ± 0,78		75
		+	68,4 ± 4,8	13,9 ± 0,72	+ 1,2	84
	11 Std	—	17,3 ± 2,4	18,0 ± 1,24	+ 5,3	25
		+	65,0 ± 4,2	17,5 ± 1,23	+ 4,8	37
FS. 4-201-39	normal	—	39,3 ± 4,0	10,3 ± 0,44		87
		+	64,4 ± 4,3	10,4 ± 0,47	+ 0,1	75
	11 Std	—	29,1 ± 4,1	15,5 ± 1,04	+ 5,2	54
		+	75,0 ± 5,2	14,8 ± 1,45	+ 4,5	33

a) Tageslängenvorbehandlung vom 6. 7.—26. 8. 1959, GS (500 mg/l): 308 bis 398  $\mu$ l/Pflanze. Pflanzen am 14. 3. 1960 auf drei Knospen zurückgeschnitten. — b) Stichtag der Berechnung: 20. 3. 1960. — c) Ausgetriebene Knospen.

Bild wurde an Gewebeexplantaten gewonnen, bei denen sich die photoperiodisch induzierte Wachstumshemmung der Mutterpflanzen auf das Wachstum der Gewebekulturen übertrug. Selbst wenn das Längenwachstum der im Kurztag wachsenden Mutterpflanzen durch GS-Applikation aufrechterhalten wurde, blieb der Kurztaghemmeffekt auf die Explantate unverändert<sup>3)</sup>.

Eingehendere Experimente, wovon ein charakteristisches Beispiel in Tabelle 2 wiedergegeben ist, haben erkennen lassen, daß die Knospenruhe unabhängig von der Intensität des Triebängenwachstums durch Kurztag induziert wird. Sowohl bei jungen Pflanzen, die ihr Längenwachstum nach 18- bis 24-tägiger Kurztageinwirkung einstellen, als auch bei jenen, die durch kontinuierliche GS-Applikation genauso rasch wuchsen wie die im Normaltag mit Gibberellin behandelten Pflanzen, war die Knospenaustriebsbereitschaft nach 62-tägiger Kurztagevorbehandlung nahezu vollständig unterdrückt. Indes rief die gleiche Gibberellinbehandlung im Normaltag keine signifikante Veränderung der Austriebsgeschwindigkeit hervor.

Beachtenswert ist ferner, daß bei Riesling noch nach 40-tägiger Kurztageinwirkung eine Reaktivierung des Sproßmeristems durch Gibberellin möglich ist. In einem im Klimaraum durchgeführten Versuch war gleiches nach 66 Tagen Kurztagevorbehandlung (Tageslänge 11 Std) zu beobachten, während das Sproßmeristem eines Zuchtstammes (FS. 4-195-39) bereits nach 15 bis 25 Tagen irreversibel gehemmt war. Hinsichtlich der Gibberellinwirkung auf die Knospenruhe lieferte auch dieses Experiment prinzipiell dasselbe Ergebnis wie in Tabelle 2.

So ist mit Hilfe von Gibberellin eine Trennung jener Vorgänge zu erzielen, die einerseits zum Wachstumsstillstand der Triebe und andererseits zur Wachstumsruhe der Knospen