

Über die Sichtbarmachung von ungesättigten Lipoiden auf Papier und in histologischen Schnitten

Bei der üblichen Anfärbung der Lipoleide mit Sudanfarbstoffen, wie Ölrot 0¹⁾ oder Sudanschwarz²⁾, werden alle Lipoidfraktionen sichtbar, ohne Differenzierung der gesättigten und ungesättigten Fette. Wir erreichen eine solche Differenzierung, indem wir an die ungesättigten Bindungen der Fettsäuren Halogen (Jodchlorid, Jodbromid, Jod) addieren, dieses Halogen dann in Halogensilber überführen und das Halogensilber anschließend zu Silber reduzieren.

Ausführung: Die getrockneten und durch Erhitzen fixierten Pherogramme werden kurz in destilliertem Wasser ausgewaschen, um die Puffersalze zu entfernen (5 min), und wieder getrocknet. Sie werden 5 min lang in eine frisch hergestellte, annähernd gesättigte wäßrige Lösung von Jodchlorid oder Jodbromid gelegt. Dann wäscht man unter 5maligem Wasserwechsel 1 Std lang mit destilliertem Wasser aus; es empfiehlt sich, das Waschwasser mechanisch zu bewegen. Der Streifen kommt dann für 5 min in eine wäßrige $n/5$ AgNO₃-Lösung. Zur Entfernung des AgNO₃-Überschusses wird 10 min mit Aqua dest. gewässert, 40 min mit $n/10$ HNO₃ (3mal wechseln) und schließlich wieder mit Aqua dest. 10 min lang gewaschen. Das Halogensilber wird mit einem photographischen Entwickler (z. B. Eukobrom) geschwärzt (10 bis 15 min), und zum Schluß wird der Entwickler gründlich ausgewässert.

Die Reaktion erwies sich in Modellversuchen als für ungesättigte aliphatische Verbindungen spezifisch, so daß unter den Bestandteilen des Serums nur die ungesättigten Fettsäuren für die Reaktion in Frage kommen. Proteine, gesättigte Fette, gesättigte Phosphatide, Vitamin C, ungesättigte Steroide, Nukleinsäuren geben die Reaktion nicht. Jodbromid gibt etwas tiefere Schwärzungen als Jodchlorid.

Eine weniger spezifische Anfärbung, bei der neben den ungesättigten Fetten auch gesättigte Phosphatide erfaßt werden, geben Leukotriphenylmethanfarbstoffe. Am geeignetsten erwies sich Leukomalachitgrün, obwohl z. B. auch Fuchsin, Neufuchsin, Krystallviolett, Methylviolett 6B eine entsprechende Anfärbung geben; allerdings ist es bei diesen Farbstoffen schwerer, farblose Untergründe zu bekommen.

Ausführung: Nach Auswaschen der Puffersalze und Trocknen wird das Pherogramm 10 min lang in einer frisch bereiteten Lösung von Leukomalachitgrün gebadet und anschließend etwa $1\frac{1}{2}$ Std lang unter häufigerem Wasserwechsel (alle 10 bis 15 min) ausgewässert. Die Leukomalachitgrünlösung stellt man durch Entfärben einer filtrierten wäßrigen Malachitgrünlösung (0,1 bis 0,15%ig) unter tropfenweisem Zusatz einer wäßrigen Na-dithionitlösung her.

Bei der Anwendung obiger Färbemethoden auf Pherogramme von Normalseren wurden gesättigte und ungesättigte Lipoleide in gleichen Zonen lokalisiert (β -Globulinbereich); eine Auftrennung nach gesättigten und ungesättigten Lipoiden wurde nicht beobachtet.

Für die allgemeine Lipoidfärbung ziehen wir das Sudan 7B dem Ölrot 0 wegen der brillanteren Färbung vor. Besonders für histologische Präparate hat sich bewährt, den Farbstoff statt in 60%igem Alkohol in Tween-80-haltigem Wasser zu lösen. Man geht dabei von einer 0,4%igen Lösung von Sudan 7B in Tween-80 aus, die man zum Gebrauch 1:10 bis 1:20 mit Wasser verdünnt. Der Farbstoffüberschuß läßt sich leicht durch einfaches Wässern entfernen.

Einzelheiten über die Färbetechnik mit obigen Methoden an histologischen Präparaten werden an anderer Stelle mitgeteilt.

Hauptlaboratorium der Schering A.-G., Berlin-West

JEAN BARROLLIER

Eingegangen am 6. Juli 1957

¹⁾ DURRUM, E. L., M. H. PAUL u. E. R. B. SMITH: Science [Lancaster, Pa.] 116, 428 (1952). — ²⁾ SWAHN, B.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. 4, 98 (1952).

Replacement of the Requirement for Vernalisation in *Centaureium minus* Moench by Gibberellic Acid

Centaureium minus Moench, a species some forms of which have a basal rosette, is native to Australia and is common in Victoria and in other Australian States. We have been able to show that forms which have a basal rosette require exposure to low temperature (vernalisation) before they are capable of flowering. Rosettes have been kept for over a year in the vegetative condition in long days in a warm greenhouse. Other forms of *C. minus* are long-day plants which do not require

Table 1

Group	Number of plants	Daylength (hours)	Amount of Ga applied daily	Total amount of Ga applied per plant
			μ gm	μ gm
A	8	8	—	—
B	8	Continuous light	—	—
C	6	8	2	30
D	6	8	5	75
E	6	Continuous light	2	30
F	6	Continuous light	5	75

vernalisation (fig. 1). Forty rosettes raised under natural daylength (over 14 hours) in warm greenhouses were arranged for treatment as in Table 1.

The solutions were applied each day for 15 days as a 0.5 ml drop to the centre of each rosette. Controls were treated with water. Treatment with Ga***) was discontinued a few days after elongation had begun. The internodes of plants



Fig. 1. *Centaureium minus*, 9 weeks after commencing experiment. Above, plants kept in short days and, from left to right, treated with 0.2 and 5 μ gm Ga each day. Below, plants in continuous light and, from left to right, with 0.2 and 5 μ gm Ga each day. Note aerial rosettes in short days and flowering in long days after Ga treatment

of Groups E and F continued to elongate and in four weeks these plants had obvious flower primordia. The internodes plants of Groups C and D ceased to elongate a few days after discontinuing Ga-application, and the new leaves formed were grouped in the form of an aerial rosette terminating each elongated shoot. No flowers were formed by these plants. Control plants remained vegetative under both long and short-day conditions.

LANG^{3b)} leaves open the possibility of induction of flowering in *Hyoscyamus niger* (biennial) by Ga under short-day conditions. It is thus not clear whether Ga can replace only the requirement for vernalisation (i.e. is equivalent to "vernalinalin") or whether it can also replace the necessity for long days (i.e. is equivalent to "florigen") in *H. niger*. Ga has been shown^{1), 3a)} to replace requirements for long days in other plants and hence either to be equivalent to the flower hormone or to mediate its production by the plant. However it has been stated^{2), 3c)} that Ga has no flower-inducing effects on well-known short-day plants, although it is commonly assumed that the flower hormone is identical in both short-day and long-day plants. However, the amounts of Ga applied in some of the reported experiments seem excessive (as much as $2\frac{1}{2}$ months of daily applications of 10 μ gm!) in comparison with the amounts which are effective in *C. minus*. It is clear that Ga cannot be the direct equivalent of the natural flower hormone. Our experiment indicates that, at least for *C. minus*, Ga is possibly identical with vernalin³⁾. It is of interest that in plants in short days stem elongation ceases shortly after the cessation of Ga application, but stem elongation continues in long days without an exogenous supply of Ga. If the rosette habit is due to a genetic block in the synthesis of gibberellin — a block which is removed by cold treatment — then the

applied Ga may act as a "starter" and comparatively small amounts will enable further synthesis to take place. This synthesis takes place, however, *only under long-day conditions* in *C. minus*. WAGNER and HADDOX⁶⁾ have shown that, under suitable conditions, certain pantthenicless mutants of *Neurospora* will grow on minimal media if they are provided with "starter" amounts of the required vitamin.

The suggestion that vernalisation results in a change in the plant such that it is subsequently able to synthesize Ga (or a similar substance) under long-day but not under short-day conditions is in accord with the report⁴⁾ that fully vernalised *Hyoscyamus niger* plants kept in short days may remain indefinitely in the rosette stage, but undergo stem elongation when transferred to long days. In support of this concept we have observed that elongation recommenced in some of the Ga-treated plants of groups C and D when transferred to long-day conditions and at least one of these plants has subsequently flowered.

Department of Botany, Melbourne University, Victoria, Australia

D. J. CARR*), A. J. MCCOMB**) and L. D. OSBORNE

Eingegangen am 25. Juni 1957

*) The senior author wishes to thank the Commonwealth Bank of Australia (Rural Credits Development Fund) for a grant in support of this work.

**) Mr. McCOMB is a CSIRO post-graduate Scholar.

***) Ga supplied by I. C. I. Ltd. We would like to thank Mr. B. D. ROBINSON and Mr. F. J. A. THOMAS, ICI, ANZ, Merrindale, Victoria, for arranging the supply of Ga.

¹⁾ BÜNSOW, R., and R. HARDER: Naturwiss. 43, 479, 527 (1956). — ²⁾ HARDER, R., and R. BÜNSOW: Naturwiss. 43, 544 (1956). — ³⁾ LANG, A.: Naturwiss. 43, a) 257, b) 284, c) 544 (1956). — ⁴⁾ LANG, A., and G. MELCHERS: Planta 33, 653 (1943). — ⁵⁾ MELCHERS, G., and A. LANG: Biol. Zbl. 67, 105 (1948). — ⁶⁾ WAGNER, R. P., and C. H. HADDOX: Amer. Naturalist 85, 319 (1951).

Gibberellinsäure und Blattwachstum

Durch Behandlung junger vegetativer Sprosse von *Opuntia bergeriana* WEB. mit 0,005%iger Gibberellinsäure (GS) konnte LAIBACH¹⁾ das Wachstum der an diesen Sprossen entstehenden walzenförmigen Blätter gegenüber den Blättern unbehandelte Sprosse steigern. Auch erfuhren die Dornen und Glochiden der Areolen in den Achseln dieser Blätter eine sehr auffällige Verlängerung, so daß die behandelten Sprosse schon allein dadurch, abgesehen von der stärkeren Streckung,

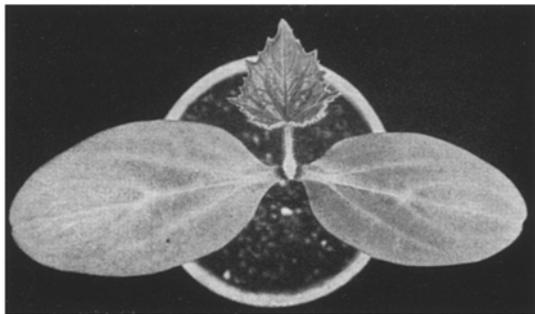


Fig. 1. Keimling von *Cucumis sativus* L., dessen linker Kotyledon mit Gibberellinsäure, dessen rechter mit Wasser gespritzt worden war

ein von den unbehandelten völlig abweichendes Aussehen erhielten. Das ähnliche Reagieren von Blättern und Dornen (bzw. Glochiden) auf GS-Behandlung ist insofern nicht so merkwürdig, als ja die Kakteendornen und -Borsten (-Glochiden) gewöhnlich als metamorphosierte Blätter angesehen werden.

Inzwischen ist es mir gelungen, an Gurkenkotyledonen (etwa 3,5 cm lang) eine ganz eindeutige Wachstumsförderung zu erzielen. An diesem Versuchsobjekte hatte ich vor einiger Zeit eine Methode entwickelt, um die Wirkung von Lösungen, die man einem Kotyledon in das Interzellularsystem einspritzt, auf das Wachstum des Hypokotyls zu studieren. Die Einzelheiten der Methodik können in der darüber erschienenen Arbeit nachgesehen werden²⁾.

Es sei hier nur kurz erwähnt, daß die Gurkensamen in feuchtem Sägemehl zum Keimen gebracht und dann in kleinen Töpfen mit Komposterde eingepflanzt werden. Um das Entstehen phototropischer Krümmungen im Gewächs-

haus zu verhindern, stehen die Töpfchen auf einer sich um eine senkrechte Achse langsam drehenden Scheibe. Wenn die Kotyledonen ergrünt sind und eine Länge von etwa 3,5 cm erreicht haben, wird mittels einer Rekordspritze durch einen Einstich von der Oberseite des Kotyledons die Flüssigkeit injiziert, bis die Interzellularen gefüllt sind, was man an der dunkleren Färbung des Kotyledons erkennt.

Wurde einem Keimblatt von *Cucumis sativus* L. eine Lösung von 50 μ /cm³ GS eingespritzt, während sein Partner unbehandelt blieb oder mit Wasser gespritzt wurde, so wuchs die Hypokotylflanke unterhalb des mit GS gespritzten Kotyledons stärker als die Gegenflanke, wie dies aus der einige Stunden nach der Behandlung entstehenden Krümmung des Hypokotyls zu erkennen war. Darüber wird später an anderer Stelle berichtet werden.

Noch interessanter aber ist, daß die mit GS gespritzten Kotyledonen ohne Ausnahme nach drei Tagen viel größer geworden waren als die ungespritzten. Ihre Länge hat um 19,4%, ihre Fläche um 31,5% zugenommen (Fig. 1 und 2; Tabelle 1). Wenn jüngere, schon ergrünte, aber noch längst nicht ausgewachsene Kotyledonen (Länge etwa 2 cm) mit GS behandelt wurden, beobachtete man bereits nach 8 Std einen deutlichen Größenunterschied zwischen Versuchs- und Kontrollkeimblatt.

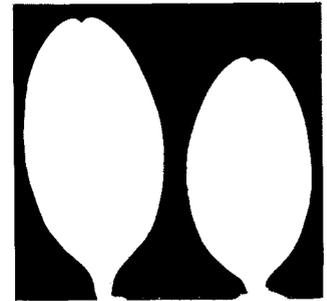


Fig. 2. Photokopie eines wie in Fig. 1 behandelten Kotyledonenpaares

Tabelle 1. Länge der Blätter (I) in cm, Blattfläche (II) in cm² nach Behandlung mit H₂O bzw. GS

	Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	M ± m
I	H ₂ O	5,7	5,9	4,9	4,7	4,6	5,3	4,8	4,4	4,4	4,5	4,9 ± 0,16
	GS	6,5	6,5	5,9	5,9	5,4	6,2	5,8	5,3	5,1	5,0	5,8 ± 0,16
II	H ₂ O	11,3	11,8	9,9	8,4	8,6	10,4	9,3	8,0	7,0	7,4	9,2 ± 0,49
	GS	14,4	13,1	12,4	12,2	11,9	13,3	12,6	10,9	9,5	10,7	12,1 ± 0,43

Bei meinen früheren Versuchen hatte ich eine Vergrößerung der Kotyledonen nach Einspritzen von β -Indoleessigsäure (IES) nie beobachtet, obwohl bei den Versuchen die IES-Konzentrationen stark variiert wurden. Auch bei den jetzt durchgeführten IES-Injektionen wurde kein stärkeres Blattwachstum festgestellt. Nur der Kotyledostiel erfuhr eine beträchtliche Verlängerung; aber auch die Blattstiele der meisten mit GS behandelten Keimblätter erreichten eine etwas größere Länge als die der Wasserkontrollen. Die GS stellt also einen das Blattwachstum stark fördernden Wuchsstoff dar; ob er als der Blattwuchsstoff angesehen werden muß, bleibt abzuwarten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Unterstützung unserer Arbeiten, Herrn Dr. CURT LEBEN von der Eli Lilly a. Co, Indianapolis, Indiana, für die Versorgung mit Gibberellin und Herrn HANS-JOACHIM REISENER für die wertvolle Mithilfe bei den Versuchen.

Biologisches Forschungsinstitut, Limburg/Lahn

F. J. KRIBBEN

Eingegangen am 2. Juli 1957

¹⁾ LAIBACH, F.: Ber. dtsh. bot. Ges. 70, 199 (1957) und Vortrag auf der Botanikertagung am 12. 6. 57 in Heidelberg. — ²⁾ KRIBBEN, F. J.: Ber. dtsh. bot. Ges. 57, 526 (1940).

Über die geotropische „Mneme“

I. Werden Keimpflanzen von *Helianthus annuus* auf +4° C abgekühlt, so verlieren die Hypokotyle die Fähigkeit zur geotropischen Aufkrümmung aus der Horizontallage. Stellt man die in der Kälte horizontal exponierten Keimlinge wieder senkrecht und erwärmt sie auf 20° C, so treten bald intensive Krümmungen im Sinne der vorherigen Reizung auf. Dieses Ergebnis bestätigt zunächst die alten Beobachtungen von CZAPEK²⁾, daß bei Temperaturen, die geotropische Krümmungen nicht mehr zustande kommen lassen, die geotropische Perzeptionsfähigkeit noch nicht erloschen zu sein braucht. Darüber hinaus konnten wir aber feststellen, daß die „Erinnerung“ an eine frühere Induktion in der Kälte noch viele