

# ACTA BIOLOGICA

## ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

B. FALUDI, V. FRENYÓ, B. GYŐRFFY, J. SZENTÁGOTHAI,  
A. TIGYI, J. TIGYI

R E D I G I T

I. TÖRÖ

TOMUS XI

FASCICULUS 1



1960

ACTA BIOL. HUNG.

# ACTA BIOLOGICA

## A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA BIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTŐSÉG : BUDAPEST IX., TŰZOLTÓ U. 58. KIADÓHIVATAL : BUDAPEST V., ALKOTMÁNY U. 21.

Az *Acta Biologica* angol, francia, német és orosz nyelven közöl értekezéseket a biológia köréből.

Az *Acta Biologica* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet. Évenként 1–2 kötet jelenik meg.

A közlésre szánt kéziratok a következő címre küldendők:

*Acta Biologica* szerkesztősége, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi és kiadóhivatali levelezés.

Az *Acta Biologica* előfizetési ára kötetenként belföldre 80 Ft, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-46), a külföld számára pedig a „Kultúra” Könyv- és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Bankszámla : 43-790-057-181) vagy annak külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

---

Die *Acta Biologica* veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereich der biologischen Wissenschaften in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die *Acta Biologica* erscheinen in Heften wechselnden Umfangs. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an folgende Adresse zu senden :

*Acta Biologica*, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

An die gleiche Anschrift ist auch jede Korrespondenz für die Redaktion und den Verlag zu senden.

Abonnementspreis pro Band : 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Außenhandels-Unternehmen »Kultura« (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Bankkonto No. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

## INDEX

CSABAY, L.—HORVÁTH, L.—FERENCSZ, A.: Studies on the O <sub>2</sub> consumption of chick embryos by a modified WARBURG method .....	1
KOVÁCS, J.: Cytophysiological studies on the LEYDIG cells of mouse testis .....	7
JÁMBOR, B.—DÉVAY, M.: Changes in the activity of dehydrogenases during storage of yeast .....	15
VIGH, B.: Über die Regeneration der Augenlinse des Rippenmolches ( <i>Pleurodeles waltlii</i> ) .....	25
GYÉVAI, A. T.: Herzstudien. III. Histologische und histochemische Untersuchungen am Herzen von <i>Abramis brama</i> .....	35
FALUDI, B.—FALUDI-DÁNIEL, A.: Role of the alterations in phosphorous metabolism in resistance to dichlorophenoxyacetic acid .....	43
NYIRI, L.: The bio-assay of primycin .....	57
FELFÖLDY, L. J. M.: Experiments on the carbonate assimilation of some unicellular algae by RUTTNER's conductometric method .....	67
DVIHALY, Zs. T.: Calculation of underwater distribution of radiant energy as a problem of production biology .....	77
PALKOVITS, M.—FÖLDVÁRI, I. P.: Über die antidiuretische Wirkung des Organon submissurale .....	91
MOLNÁR, Gy.—TÖLG, I.: Untersuchung der Dauer der Magenverdauung des Zanders ( <i>Lucioperca lucioperca</i> L.) mittels einer röntgenologischen Methode .....	103
SÁRINGER, Gy.: Untersuchungen über die Ökologie des Senfkäfers ( <i>Collaphellus sophiae</i> SCHALL.) .....	109
HOLLÓSI, G.—BENEDECZKY, I.—TÍGYI, A.—LISSÁK K.: The role of the nervous system in the maintenance of the ribonucleic acid and desoxyribonucleic acid content of striated muscle .....	145
VERZÁR-PETRI, G.—BARANYAI-SZENTPÉTERY, G.: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des Gynäzeums von <i>Datura stramonium</i> L. ....	155
FELFÖLDY, L. J. M.: The role of age and training in carbonate assimilation of unicellular algae .....	175
KOL, E.—VARGA, L.: Beiträge zur Kenntnis der Mikroflora und Mikrofauna in den Donauarmen neben Baja (Südgarn) .....	187
DOMJÁN, Gy.—MINKER, E.: Untersuchung der Phosphomonoesterasen in den zentralen Nervenganglien der Weinbergschnecke ( <i>Helix pomatia</i> ) .....	219
MUNKÁCSI, F.: Die Veränderungen der Bluteiweißfraktionen mit dem fortschreitenden Alter der Pferde .....	231
THOMA, A.: Age at menarche, acceleration and heritability .....	241
KORMOS, K.: Ruhezustand bei den Protozoen mittels Metamorphose .....	255

KURCZ, M.: A comparative study of the spontaneous activity of the white rat and the brown or wharf-rat .....	271
FALUDI, B.—FALUDI-DÁNIEL, A.—GYURJÁN, I.: Genetical differences in the photosynthetical utilisation of light. I. Lability of assimilatory pigments at different light intensities .....	285
OLÁH, É.—HADHÁZY, Cs.—KOSTENSKY, K.: Untersuchungen über die Knorpelbildung. IV. Das Gewebsatmungsvermögen der regenerierenden Gelenkfläche in den verschiedenen Regenerationsstadien .....	295
KOROTKOVA, G. P.: Regeneration and somatic embryogenesis in the calcareous sponge <i>Leucosolenia complicata</i> MENT. ....	315
KORMOS, J.—KORMOS, K.: Phylogenetische Wertung konvergenter und divergenter Eigenschaften bei den Suktorien .....	335
KÁRPÁTI, V.—KÁRPÁTI, I.: Winter dormancy of Hungarian trees and shrubs. I. Trees and shrubs of natural groves .....	359
ZADOR, S.: Effect of temperature on the redox potential in bacterial cultures.....	387
SZABÓ, K.: The changes of the bound amino acid composition of the shoot apex — developing into male inflorescence — of maize, during differentiation .....	393
NÉMETH, G.—CSIK, L.: Effect of penicillin on <i>Tetrahymena pyriformis</i> , strain Gl. I. Multiplication and change of form .....	405
GAZSÓ, L. R.—TÖRÖK, L. J.—RAPPAY, Gy.: Contributions to the histochemistry of the nervous system of planarians .....	411

## INDEX AUTORUM

B	
Baranyay-Szentpétery, G.	155
Benedeczky, I.	145
C	
Csabay, L.	1
Csík, L.	405
D	
Dévay, M.	15
Domján, Gy.	219
Dvihally, Zs. T.	77
F	
Faludi, B.	43, 285
Faludi-Dániel, A.	43, 285
Felföldy, L. J. M.	67, 175
Ferencz, A.	1
Földvári, I. P.	91
G	
Gazsó, L. R.	411
Gyévai, A. T.	35
Gyurján, I.	281
H	
Hadházy, Cs.	295
Hollósi, G.	145
Horváth, L.	1
J	
Jámbor, B.	15
K	
Kárpáti, I.	359
Kárpáti, V.	359
Kol, E.	187
Kormos, J.	335
Kormos, K.	255, 335
Korotkova, G. P.	315
Kostenszky, K.	295
L	
Lissák, K.	145
M	
Minker, E.	219
Molnár, Gy.	103
Munkácsy, F.	231
N	
Németh, G.	405
Nyiri, L.	57
O	
Olah, É.	295
P	
Palkovits, M.	91
R	
Rappay, Gy.	411
S	
Sáringér, Gy.	109
Szabó, K.	393
T	
Thoma, A.	241
Tigyi, A.	145
Tölg, I.	103
Török, L. J.	411
V	
Varga, L.	187
Verzár—Petri, G.	155
Vigh, B.	25
Z	
Zador, S.	387



# ACTA BIOLOGICA

## ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

B. FALUDI, V. FRENYÓ, B. GYŐRFFY, B. MÉSZÁROS,  
J. SZENTÁGOTTHAI, A. TIGYI, J. TIGYI

REDIGIT  
I. TÖRŐ

TOMUS XI



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST  
1961



# STUDIES ON THE O<sub>2</sub> CONSUMPTION OF CHICK EMBRYOS BY A MODIFIED WARBURG METHOD

L. CSABAY, L. HORVÁTH and A. FERENCZ

CHAIR OF ANATOMY AND PHYSIOLOGY, COLLEGE FOR SPECIAL PEDAGOGY  
BUDAPEST (HEAD: L. HORVÁTH)

(Received June 15, 1959)

## Summary

Authors have developed a new method for studying the metabolism of the embryos of oviparous animals. The method is described and data are presented as to the rate of oxygen consumption during the growth of the chick embryo. The problems that may be elucidated by the use of the method are outlined in brief.

Research has elucidated many of the metabolic processes. We have undertaken to contribute to our knowledge of the embryonic metabolism.

The metabolism of certain embryonic tissues, viscera, parts of viscera has been studied at several times by many workers independently. LUSSANA, BOHR, HASSELBACH and MURRAY [2] have measured the RQ of eggs. The results, however, are very divergent. BRACHET and NEEDHAM [2] have studied the O<sub>2</sub> comsumption of the allantois and yolk sac. Another group of workers employed the manometric O<sub>2</sub> determination technique in their studies on the O<sub>2</sub> consumption of isolated embryonic viscera. For example, CARROL [2] studied the changes in the O<sub>2</sub> consumption of the liver, KIHARA [2] examined those of the ocular lens, and KIYOHARA [2] investigated those of the retina.

Our method is new from that point of view that by its use we may gain insight into the changes of the metabolism of the developing organism as a whole, from the blastula stage till the completion of embryonic life.

## Methods

Essentially, our method is a modification of the manometric method of WARBURG [1]. The difference from the latter may be outlined as follows.

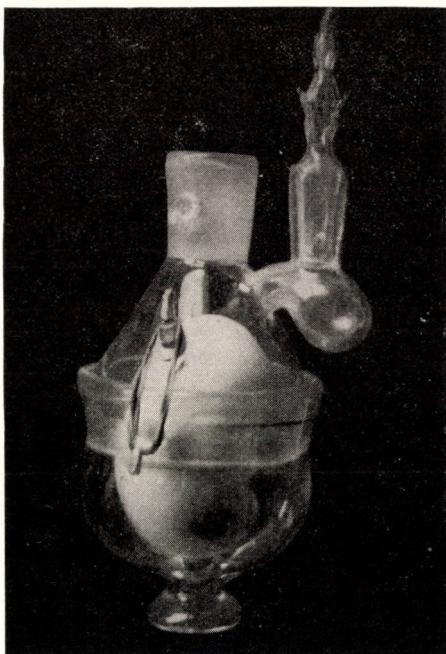
1. The vessel used makes it possible to carry out the tests in intact eggs (Fig. 1).
2. In the manometers the BRODIE solution is replaced by mercury. This is necessary because of the great changes in pressure.

We have used 30 registered Rhode Island Red eggs in our experiments.

The eggs were weighed and their volume was determined by means of an apparatus devised by us for this purpose (Fig. 2). The volume of the egg is given by the gravimetric measurement of the liquid displaced. After that, 1 ml of a 20 per cent KOH solution was placed into the container at the bottom of the vessel, was spread over a large surface, then the eggs were placed into the factorized manometer vessels, they were connected with the manometers and in every case 3 to 4 litres of O<sub>2</sub> were flown through the apparatus. The diagram of the apparatus is shown in Fig. 3. The apparatus was then placed into a water bath of 37° C and was closed after 15 minutes of pre-heating. Oxygen consumption was determined by direct measurement.

### Results

Prior to the onset of incubation the eggs showed no appreciable oxygen consumption. The eggs were then transferred to the incubators and regular incubation at 37° C was begun. Metabolic tests were made daily. The oxygen consumption of each egg was studied for 1 hour. Within 1 hour the oxygen consumption changed linearly. The average O<sub>2</sub> consumption (in  $\mu\text{l}$ ) and the O<sub>2</sub> consumption per 1 g of egg (in  $\mu\text{l}$ ) are shown in Table 1. The standard deviation

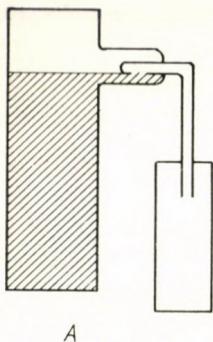


*Fig. 1.* The manometer vessel used

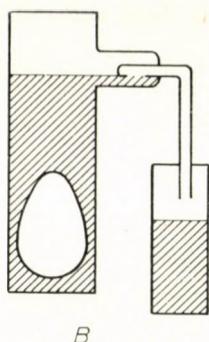
values relate to the O<sub>2</sub> consumption per 1 g of egg. The results are represented graphically in Fig. 4.

### Discussion

The metabolic rate increases markedly on the 10th—11th day, reaching the maximum at the 19th day. Then, oxygen consumption steeply decreases. This may be explained by the fact that on the 19th day the embryo replaces gas exchange through the chorio-allantoic vessels by respiration with the lungs.

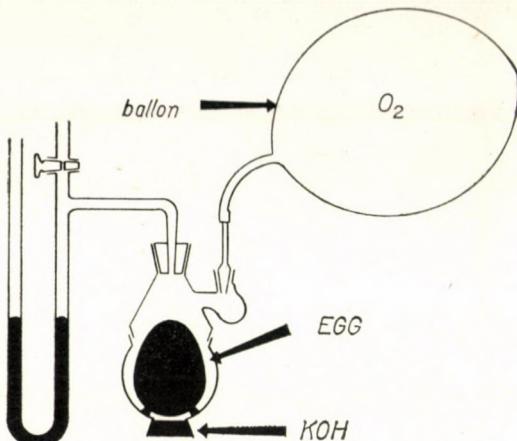


A



B

*Fig. 2. Diagrammatic representation of the function of the apparatus for determining egg volume*



*Fig. 3. Diagram of the test apparatus*

**Table 1**

Duration of incubation, days	Mean O <sub>2</sub> consumption $\mu\text{l}$	O <sub>2</sub> consumption of 1 g egg, $\mu\text{l}$	SD $\pm$
4	9.930	0.196	0.061
5	23.060	0.406	0.108
6	38.435	0.692	0.154
7	64.530	1.144	0.311
8	94.665	1.665	0.398
9	110.883	1.964	0.490
10	155.709	2.755	0.857
11	245.892	4.317	1.022
12	397.969	6.930	1.203
13	490.780	8.551	1.524
14	706.949	12.485	2.541
15	855.812	15.034	2.784
16	977.588	16.985	3.164
17	1028.509	18.080	3.476
18	1140.970	19.826	3.482
19	1165.080	20.594	3.501
20	931.346	16.590	4.504
21	1114.555	16.994	4.876
22	1218.147	24.202	5.000

It is likely that the breaking of the egg-shell, the hatching, results from the hypoxaemia. Subsequently, oxygen consumption continues to increase steeply.

In many cases other eggs showed markedly different oxygen consumption rates during hatching. The deviation from the mean in the oxygen consumption of 3 eggs is shown in Fig. 5.

The chicks hatched from these eggs exhibited developmental disorders. There may be a correlation between the malformations and the divergent oxy-

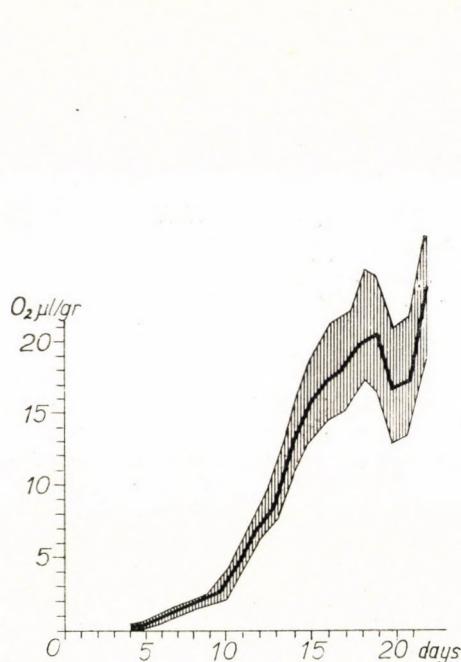


Fig. 4. Changes in the oxygen consumption of 1 g of egg during hatching. (Solid line: mean values. Shaded area: standard deviation from the mean)

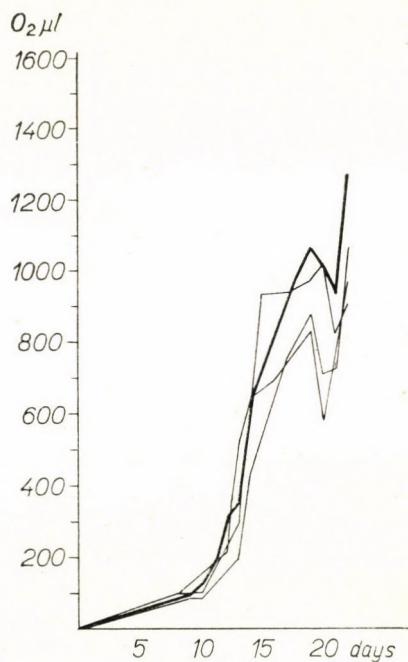


Fig. 5. Oxygen consumption of chick embryos showing developmental disorders. Solid line: mean values

gen consumption. The malformations observed included ectopy of the heart, parrot beak, coelosomia.

In further studies we shall try to elucidate the changes the development of single viscera causes in the metabolism of the embryo, on the one hand, and, on the other, the developmental disorders and the secondary changes in metabolism that may be produced by chemical, physical or biological effects. These experiments are in progress.

#### LITERATURE

1. DÉNES, G., SZÉKELY, M. (1958) Manometriás mérőműszerek. Manometric methods. In Kovách, A. Kísérletes orvostudomány vizsgáló módszerei. Methods in experimental medicine. Akadémiai Kiadó, Budapest. 4, 423—555. (In Hungarian.)
2. NEEDHAM, J. (1950) Biochemistry and morphogenesis. University Press, Cambridge.

**UNTERSUCHUNG DES O<sub>2</sub>-VERBRAUCHS VON HÜHNEREMBRYOS MIT EINER  
MODIFIZIERTEN WARBURG-METHODE**

Verfasser haben eine neue Methode zur Stoffwechseluntersuchung von Embryos der sich durch Eier vermehrenden Tiere ausgearbeitet. Außer der Beschreibung der Methode wird auch der durchschnittliche Sauerstoffverbrauch während der Entwicklung des Hühnerembryos mitgeteilt. Ferner werden die mit Hilfe der Methode auszuarbeitenden Fragen kurz umrissen.

**ИССЛЕДОВАНИЕ РАСХОДА О<sub>2</sub> ЗАРОДЫШЕЙ ЦЫПЛЯТ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА  
ВАРБУРГА**

Авторы разработали новый метод для исследования обмена веществ зародышей птиц и пресмыкающихся. Кроме изложения метода сообщается также средний расход кислорода во время развития зародышей цыплят и дается краткий очерк разрабатываемых при помощи метода вопросов.

LÁSZLÓ CSABAY, Budapest, VII. Bethlen G. tér 2. Hungary.

LÁSZLÓ HORVÁTH, Budapest, VII. Bethlen G. tér 2. Hungary.

ANTAL FERENCZ, Budapest. VII. Bethlen G. tér 2. Hungary.



# CYTOPHYSIOLOGICAL STUDIES ON THE LEYDIG CELLS OF THE MOUSE TESTIS

J. KOVÁCS

INSTITUTE OF GENERAL ZOOLOGY, EÖTVÖS LORÁND UNIVERSITY OF SCIENCES, BUDAPEST  
(HEAD: G. MÖDLINGER)

(Received September 10, 1959)

## Summary

In the cytoplasm of the LEYDIG cells of the mouse testis adjacent to the nucleus a sphere is visible, that contains PAS-positive granules and that is apparently in close correlation with the GOLGI apparatus. The sphere does not stain with basic stains, while the rest of the cytoplasm is basophilic, owing chiefly to the presence of RNA-containing substance. The basophilia is most marked around the sphere. In response to gonadotrophin the nucleus, nucleolus and cytoplasm increase in size, the sphere and the halo of RNA around it become more distinct. These structural changes may furnish a morphological basis for the evaluation of the functional state of the cell.

## Introduction

The functional role to be attributed to single structures is always an outstanding problem in the cytological studies of organs. One way to approach such problems is to stimulate the organ in question to intense activity by external effects and to observe the resulting changes in single structures. We have examined in this way the LEYDIG cells of the albino mouse testis, devoting particular attention to certain properties (basophilia of the cytoplasm, the presence of PAS-positive substance adjacent to the nucleus) that, as far as we know it, have not been studied in detail hitherto. The data reported here are the results of these investigations.

## Materials and methods

29 male albino mice, weighing 23 to 26 g were used. One group was treated with gonadotrophin (Choriogonin): each of 5 animals was given 100 I. U. in one dose, subcutaneously; each of 10 mice was given 200 I. U., injecting 50 I. U. subcutaneously, every other day. 14 animals served as controls. The animals were killed by decapitation, the testes, epididymes, seminal vesicle and prostate were fixed, using Susa, Bouin, Helly, Champy and Carnoy fixatives, 5 per cent neutral formalin, 2 per cent or 0.1 per cent buffered (pH 7)  $\text{OsO}_4$  for this purpose. The fixed specimens were embedded by the methylbenzoate-paraffine technique and the sections were stained with haematoxylin-eosin, PAS-haematoxylin, HEIDENHAIN's iron haematoxylin and azan. FEULGEN's reaction was used for the demonstration of desoxyribonucleic acid (DNA). Ribonucleic acid (RNA) was demonstrated with methylgreen-pyronin by the method of HERTL [7], and of TAFT, as well as with 1 per cent toluidine blue. The pH of the staining solution plays an important role in the detection of RNA [17, 21]; we have therefore employed solutions with the pH varying from 3 to 6, as suggested by SHABADASH [17]. The specificity of the reaction was controlled by the use of crystalline ribonuclease. Carbohydrates were demonstrated by the PAS reaction, supplemented in some cases by diastase digestion. The volume of 100 nuclei and 100 nucleoli was also determined in each animal, by a method previously described [9].

## Results

In the controls the LEYDIG cells of the testis contain one nucleus, which is round or oval in shape and which greatly varies in size even in the same animal. The nucleus is mostly eccentric in position. Chromatin granules of varying size adhere to the nuclear membrane, which sometimes shows impressions and sulci. The structure of the nucleus depends on the mode of fixation. After fixation with formalin or osmium the nucleus appears to be homogeneous, while after the use of other fixatives the chromatin is precipitated in the form of granules or filaments.

The nucleoli usually number one or two, more than that occurring only infrequently. They usually appear homogeneous, but sometimes they are vacuolized. One or more FEULGEN-positive granules are seen attached to the nucleolus, the "nucleolus associated chromatin". This was visible after treatment with any of the fixatives employed by us.

One of the most conspicuous characteristics of the cytoplasm is the presence of a perinuclear body in it, which may vary in shape and size. It is usually spherical or crescent-shaped. As it contains small granules staining with PAS, it can be demonstrated by the PAS stain. The PAS-positivity is retained even after digestion with diastase. By the PAS technique the rest of the cytoplasm stains a homogeneous light pink. Basic dyes do not stain the sphere, which is then distinct from the rest of the cytoplasm as a light spot.

By means of toluidine blue or pyronin an RNA-containing substance is demonstrable in the cytoplasm. It is present sometimes in traces only, in other instances it is evenly distributed between the vacuoles of the cytoplasm. In most cases, however, it can be found in larger quantities around the sphere and is absent at the periphery of the cytoplasm. It is mentioned that the basophilia is observable even after digestion with ribonuclease if the dye solution employed has a relatively high pH (pH 6). In this case the cytoplasm stains lightly and homogeneously with toluidine blue.

In the animals treated with gonadotrophin characteristic changes take place in both the nucleus and cytoplasm, as compared with the controls. The

**Table 1**  
*Changes in the volume of nucleus and nucleolus in response to gonadotrophin*

	Nucleus volume in percentage of control volume	Nucleolus volume in percentage of control volume
Control group .....	100	100
Animals treated with 100 I. U. gonadotrophin .....	110	114
Animals treated with 200 I. U. gonadotrophin .....	136	173

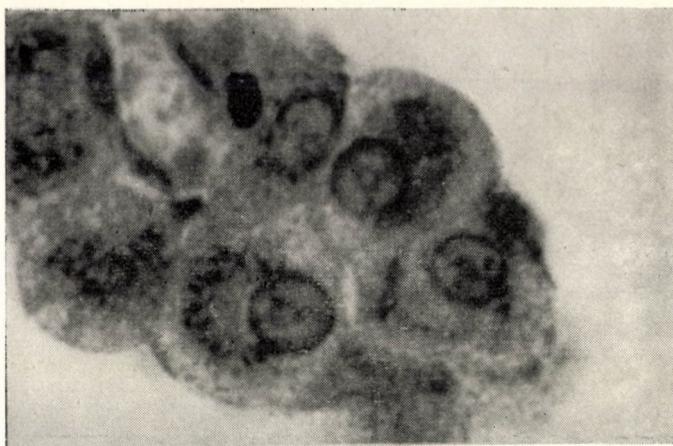


Fig. 1. LEYDIG cells, formol, toluidine blue, pH 4. Light sphere next to the nucleus, with dark-stained RNA-containing substance around it



Fig. 2. LEYDIG cells, formol, toluidine blue, plt 4. Nucleus in eccentric position

volume of the nucleus and nucleolus increases significantly. While in the control group nuclei of elongated, oval shape abound, in the gonadotrophin-treated animals most of the nuclei are round. Data relating to the increase in nuclear and nucleolar volume can be found in Table 1. It is remarkable that the volume of the nucleoli increases faster than that of the nuclei.

Likewise, the volume of the cytoplasm also increases. The same applies to the sphere, which appears as a light halo at one pole of the nucleus. At its margins we invariably find big, strongly staining, RNA-containing particles,

creating the impression as if in response to gonadotrophin the amount of RNA had increased in the cytoplasm (Figs. 1 and 2). Just like in the controls, the sphere contains PAS-positive granules (Fig. 3), and there is no appreciable difference in the PAS-positivity of the cytoplasm, either.



Fig. 3. LEYDIG cells, formol, PAS. PAS-positive granules of the sphere, next to the nucleus, in the cytoplasm

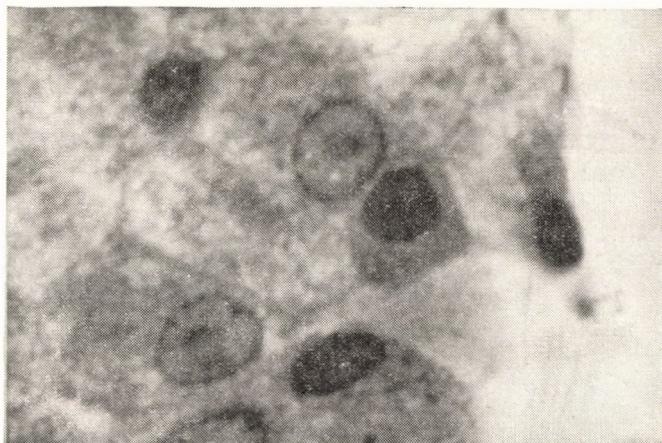


Fig. 4. LEYDIG cells, formol, PAS-haematoxylin. Cell with pyknotic nucleus and PAS-positive cytoplasm

Finally, it is mentioned that we have often found cells whose cytoplasm showed strong PAS-positivity as a whole. The nucleus and cytoplasm of such cells are invariably smaller than those of the normal LEYDIG cells, the nucleus is pyknotic (Fig. 4). Cells of this type occur in both the control and the gonadotrophin-treated animals.

### Discussion

The most conspicuous difference between the control and experimental animals was one in the size of the nucleus and nucleolus. The nuclei are also distinctly different in shape, while they are virtually not different in structure. It is emphasized, however, that further studies are required to determine the absolute value of the increase in volume and to evaluate statistically the data relating to the increase. According to TONUTTI [22, 23], as well as MUSCHKE [15] a similar increase in nuclear volume is observable in the testicular interstitium of the rat in response to gonadotrophin. These authors emphasize the relationship between the increased nuclear volume and the secretory activity.

The increase in the nucleolar volume is remarkable. The data in Table 1 reveal that the nucleolus responds more to gonadotrophin than the nucleus. According to SANDRITTER and HÜBOTTER [19], as well as MILLER [13] in the adrenal cortex there is a close correlation between the increase in the size of the nucleolus and the production of hormones. It is possible that a similar correlation exists in the interstitial cells between the changes in the nuclear and nucleolar volume and hormone output.

The importance attributed to the nucleolus associated chromatin in the genesis of the nucleolus and in protein synthesis is well-known [3]. However, MAKAROV [11, 12] reported that not only the particles visible in the nucleus, but also the nucleolus associated chromatin may be fixation artifacts. In view of this evidence we feel that the role of the nucleolus associated chromatin in the LEYDIG cells should be further investigated. Similar caution is warranted when assessing the functional significance of the sulci and impressions observed on the nucleus. In his studies on the pancreas, ALTMANN [1] interpreted these as being morphological signs of nuclear secretory activity. STOHL [20], too, has described changes indicative of nuclear secretion in the LEYDIG cells of the guinea pig testis. The secrete flowing from the nucleus into the cytoplasm then plays a part in the production of androgens. In our studies on the LEYDIG cells of the mouse testis we have found no cells in which nuclear secretory activity could have been undoubtedly proved.

Our results indicate that the cytoplasm as a whole responds most sensitively to gonadotrophin: it increases in size and as a result the interstitial tissue becomes more conspicuous. This phenomenon has been observed by other workers as well [6, 15]. As far as we know it, little attention has been devoted hitherto to the basophilia of the cytoplasm. For instance, BRACHET [2] notes that in general the endocrine glands contain little RNA. As we have now seen, RNA is concentrated mainly around the sphere. This makes it likely that the sphere has some influence on the synthesis of ribonucleo-proteins. In response to gonadotrophin, together with the increase of the cytoplasm, there seems to be an increase also in the quantity of RNA-containing substance around the sphere.

As, however, neither the toluidine blue staining, nor the methyl green-pyronin staining alone lends itself to a quantitative assay of RNA, other methods should be employed in checking up this evidence.

The significance of RNA in the interstitial cells is not known. On the basis of the results obtained in the adrenal of the rat, SANDRITTER and HÜBOTTNER [18] think it likely that ribonucleic acid has a role to play in the synthesis of steroidlike substances. Likewise, HOWARD and PELC [8] assume on the basis of studies with  $P^{32}$  that in the LEYDIG cells of the mouse testis a connexion exists between the nucleic acids and hormone secretion.

Finally, mention should be made of the sphere adjacent to the nucleus. STIEVE [19] has described in human interstitial cells a zone containing centrioles, often crescent-shaped, adjacent to the nucleus. In one of their papers MONTAGNA and HAMILTON [14] mention briefly that in the human LEYDIG cells PAS positive granules persisting even after treatment with diastase can be found next to the nucleus. Similar granules have been described in the LEYDIG cells of some species by CAVAZOS and MELAMPY [4] as well.

The structure and the connexion with the apparatus of GOLGI of the sphere are not elucidated. According to OETTLE [16], the classic GOLGI body cannot be detected *in vitro* by phase contrast microscopy in the human interstitial cells, but there is a network of canals in the cytoplasm, which, however, is bigger than the GOLGI apparatus demonstrable after impregnation. On the other hand, the GOLGI bodies are known to show PAS-positivity in many instances [5, 10]. According to LEBLOND [10], the PAS-positive granules adjacent to the nucleus correspond to the internum of the GOLGI apparatus. On this basis we are of the opinion that in the LEYDIG cells of the mouse the sphere may be considered to be a GOLGI zone. In the gonadotrophin-treated animals the sphere becomes more distinct, and for this reason this, too, may be relied upon, alongside other morphological features, in judging the functional state of the LEYDIG cells.

It is remarkable that the nucleus is often in an eccentric position and that the sphere tends to appear on the side of the nucleus facing the centre of the cell. This structure suggests some measure of functional polarity.

We have insufficient data as to the cells with PAS-positive cytoplasm observable in between the LEYDIG cells and we have found no data in the literature concerning them. This problem requires separate investigation.

#### LITERATURE

1. ALTMANN, H. W. (1952) Über den Funktionsformwechsel des Kernes im exokrinen Gewebe des Pankreas. *Z. Krebsforsch.*, **58**, 632—645.
2. BRACHET, J. (1955) The biological role of the pentose nucleic acids. In CHAGRAFF, E., DAVIDSON, J. N. *The nucleic acids*. Academic Press, New York, **2**, 475—519.

3. CASPERSSON, T. O. (1950) Cell Growth and Cell Function. New York.
4. CAVAZOS, L. F., MELAMPY, R. M. (1954) A comparative study of periodic acid-reactive carbohydrates in vertebrate testes. *Am. J. Anat.*, **95**, 461—496.
5. GERSH, J. (1949) A protein component of the Golgi apparatus. *Arch. Pathol.*, **47**, 99—109.
6. HERCHEN, H. (1954) Quantitative Untersuchungen über die Plasmarückbildung und Plasmamantfaltung der Leydig-Zellen des Rattenhodens in Abhängigkeit vom Grad der Gonadotropinstimulierung. *Endocrinologie*, **31**, 184—198.
7. HERTL, M. (1957) Zum Nucleolus Problem. *Z. Zellforsch.*, **46**, 18—51.
8. HOWARD, A., PELC, S. R. (1949)  $P^{32}$  autoradiographs of mouse testis. *Heredity*, **3**, 383.
9. KOVÁCS, J. (1959) Diurnal changes in the interstitial cells of the testicles of albino mice. *Acta Biol. Hung.*, **10**, 69—76.
10. LEBLOND, C. P. (1950) Distribution of periodic-acid-reactive carbohydrates in the adult rat. *Am. J. Anat.*, **86**, 1—50.
11. Макаров, П. В. (1956) Некоторые вопросы цитохимии нуклеиновых кислот. *Усп. совр. биол.*, **42**, 289—303.
12. Макаров, П. В. (1958) Новые данные о строении и свойствах клеточного ядра. *Apx. анат. гистол. эмбриол.*, **35**, 3—21.
13. MILLER, R. A. (1954) Quantitative changes in the nucleolus and nucleus as indices of adrenal cortical secretory activity. *Am. J. Anat.*, **95**, 497—522.
14. MONTAGNA, W., HAMILTON, J. B. (1952) Histological studies of human testes. II. *Anat. Rec.*, **112**, 237—250.
15. MUSCHKE, H. E. (1953) Histochemical Untersuchungen am Rattenhoden nach Hypophysektomie und nach Choriongonadotropinzufuhr. *Endocrinologie*, **30**, 281—294.
16. OETTLE, A. G. (1948) Golgi apparatus of living human testicular cells seen with phase-contrast microscopy. *Nature*, **162**, 76—77.
17. Шабадаш А. Л. (1959) Цитохимические особенности рибонуклеопротеидов митохондрий и эргастоплазмы. *Цитология*, **1**, 15—24.
18. SANDRITTER, W., HÜBOTTER, F. (1954) Über die Bedeutung des Nucleolus in Nebennierenrinde. *Frankfurter Z. Pathol.*, **65**, 219—229.
19. STIEVE, H. (1930) Männliche Genitalorgane. In MÖLLENDORF, W. *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Springer, Berlin.
20. STOHL, G. (1948) The Leydig interstitial cells in testes of guinea pigs. *Hung. Acta Biol.*, **1**, 11—21.
21. SWIFT, H. (1955) Cytochemical techniques for nucleic acids. In CHARGAFF, E., DAVIDSON, J. N. *The nucleic acids*. Academic Press, New York, **2**, 51—92.
22. TONUTTI, E. (1943) Zur Histophysiologie der Leydigischen Zwischenzellen des Rattenhodens. *Z. Zellforsch.*, **32**, 495—516.
23. TONUTTI, E. (1955) Über die Strukturelemente des Hodens und ihr Verhalten unter experimentellen Bedingungen. In NOWAKOWSKI, H. *Zentrale Steuerung der Sexualfunktionen. Die Keimdrüsen des Mannes*. Springer, Berlin, 146—158.

## ZYTOPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER LEYDIGSCHEN ZELLEN VON MÄUSEHODEN

Im Zytoplasma der LEYDIG'schen Zellen in den Hoden von Mäusen ist neben dem Kern eine Sphäre zu sehen. Sie enthält PJS-Reaktion zeigende Körnchen und steht vermutlich mit dem GOLGI Apparat in engem Zusammenhang. Die Sphäre lässt sich mit basischen Farbstoffen nicht färben, doch kann in den übrigen Teilen des Protoplasmas Basophilie wahrgenommen werden, die in der Hauptsache durch eine RNS enthaltende Substanz bedingt ist. Die Basophilie ist an den Rändern der Sphäre am ausgeprägtesten.

Auf Wirkung von Gonadotropin erfolgt eine Vergrößerung der Kerne und des Kernkörperchens, das Volumen des Zytosplasmas nimmt zu, die Sphäre und der sie umgebende RNS enthaltende Ring werden deutlicher sichtbar. Diese strukturellen Veränderungen können bei der Untersuchung des funktionellen Zustandes der Zelle als morphologische Grundlage dienen.

## ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА КЛЕТКАХ ЛЕЙДИГА ЯИЧЕК МЫШЕЙ

В цитоплазме клеток *Лейдига* яичек мышей видна около ядра сфера, содержащая РНК-положительные зернышки; эта сфера предположительно находится в тесной связи с внутриклеточным аппаратом *Гольджи*. Данная сфера не окрашивается основными красителями, но в остальной части цитоплазмы наблюдается базофилия, обусловленная главным образом веществом, содержащим РНК. Базофилия, как правило, выражена лучше всего вокруг краев сферы.

При действии гонадотропина ядро и ядрышко увеличиваются, объем цитоплазмы нарастает, сфера и окружающее ее кольцо с содержанием РНК становятся лучше видимыми. Данные структурные изменения могут служить морфологической основой при оценке функционального состояния клетки.

JÁNOS KOVÁCS, Budapest, VIII. Puskin u. 3., Hungary.

# CHANGES IN THE ACTIVITY OF DEHYDROGENASES DURING STORAGE OF YEAST\*

B. JÁMBOR and MÁRTA DÉVAY

INSTITUTE OF PLANT PHYSIOLOGY, EÖTVÖS LORÁND UNIVERSITY, BUDAPEST (HEAD: V. FRENYÓ) AND  
AGRICULTURAL RESEARCH INSTITUTE OF THE HUNGARIAN ACADEMY OF SCIENCES, MARTONVÁSÁR  
(HEAD: S. T. RAJKI)

(Received September 20, 1959)

## Summary

On the 4th—5th day of storage at room temperature, the activities of six dehydrogenases of baker's yeast showed rises from 100 to 300 per cent, followed by a gradual decrease on further storage.

Similarly, from the 4th—5th day of storage on, certain substrates proved to possess an inhibitory action in high concentrations.

The-afore mentioned changes appear to be suitable for estimating the staleness of yeast.

The "rising power" of baker's yeast is known to gradually decrease during storage. It is also known that, during storage, yeast practically decomposes and liquifies, due to autolysis, in a longer or shorter period. From the point of view of economics, the knowledge of biological processes taking place in yeast during storage is of extreme importance, since the details of this knowledge serve as fundamentals in evolving new methods of producing readily storable yeasts or in improving their technique.

This aim was set by the authors when studying the changes in the activity of dehydrogenases, as important catalysts of carbohydrate metabolism, during the storage of yeast. Investigations were carried out by the tetrazolium (TTC) method evolved and published earlier [5]. In the course of tests other changes of apparent interest were also studied.

## Experimental

### *Changes in dehydrogenase activity*

In the present tests "mother yeast 4" from the Budafok Yeast Factory was applied in fresh state. Yeast samples were stored in closed containers at room temperature (approximately 20° C), and the activity of different dehydrogenases was determined in samples containing various added substrates. The standard method described earlier [5] was used. Fig. 1 discloses the results expressed in micrograms of TTC consumed under the conventional conditions by 100 mg of yeast (fresh weight). It can be seen that from the 4th day of

\* Paper presented at the Second Congress of Hungarian Biochemists, Budapest, November 29, 1957.

storage on, all dehydrogenases tested show activities much exceeding the initial values. During further storage, the high activities decreased to disappear completely in most cases at the 14th day (this is not shown in Fig. 1).

Since the tests were conducted with intact yeast cells, the obtained results may be affected by the fact that penetration of TTC and various substrates is a limiting factor. It can thus be presumed that the abrupt rise of activity observed on the 4th day is only an apparent one, due to sudden changes in the permeability of cell membranes or of the cytoplasm.

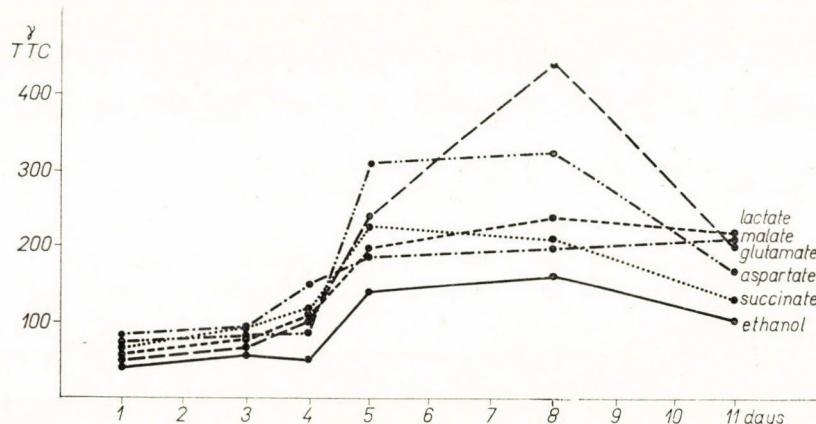


Fig. 1. Changes in the activity of dehydrogenases in baker's yeast during storage, determined by the standard method [5] (0.1 g of yeast; incubation at 37° C for 15 hours; pH = 7.5;  $10^{-2}$  M substrate,  $10^{-3}$  M TTC)

The possible role of penetration of the substrates seems plausible since it is known that organic acids are, in general, not taken up, in a dissociated state, by yeast cells, especially when the metabolic rate of cells is low [1, 7]. However, under the experimental conditions of the present tests, penetrating substances cannot be limiting factors since on incubating yeast with TTC in a solution containing the substrate as well, formation of formazanes to a degree much exceeding that of substrat-free blanks was observed. This is also supported by the fact that values of blank tests similarly showed a rapid rise from the 4th day on. Results of studies carried out with endogenous substrates only (blank tests) are not shown in Fig. 1, which indicates the data calculated from the differences of substrate-containing and blank tests.

Accordingly, in the following part, solely the possible changes in permeability referred to TTC will be considered. It was attempted to solve the problem by various approaches.

a) We wanted to prevent the intracellular reduction of TTC, carrying out incubation at pH = 11, instead of the usual pH-value. Contrary to our

expectations we learned that formazan formation considerably increased, instead of being absent (Fig. 2 "TTC dark").

The positive formazan reaction can be explained by the fact that the pH-value of the medium has no effect upon the pH of the cytoplasm of yeast cell [7], and consequently cannot influence the dehydrogenases being mainly located just in the inner part of cell.

Detection of the few dehydrogenases on the cell surface has been made possible taking use of the catalytic effect of light and a short incubation time. Under such conditions the de-

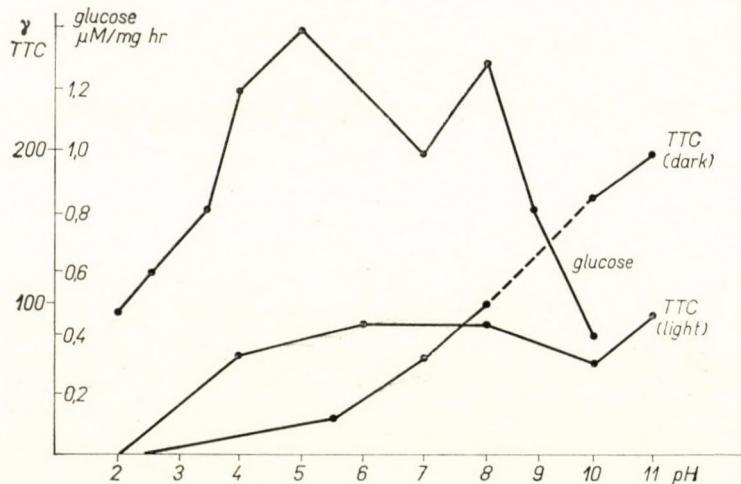


Fig. 2. Quantity of TTC reduced by 0.1 g of yeast, in micrograms; incubation at various pH, in the presence of  $10^{-3} M$  succinate, in darkness and in light (taken from [3]). The pH-curve of sugar consumption (taken from [7]) given to facilitate comparison

pendence of formazan formation on pH-value shows a quite different course (Fig. 2): the highest amount of formazan is formed at the pH-value optimal for dehydrogenases. This refers to the fact that during a short incubation time TTC penetrates only into the external sphere of the cell, where the pH-value of the medium has still an effect.

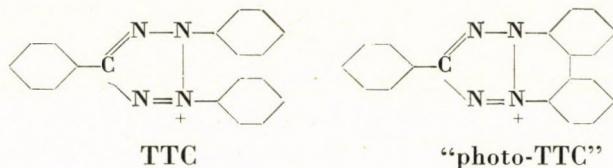
The enzymes catalyzing another important process of yeast, the fermentation, are found, in contrast to the respiratory enzymes, chiefly at the surface of the cell; therefore the pH of the medium influences fermentation considerably. Glucose consumption as a function of external pH is shown, too, for comparison in Fig. 2, based on the data of ROTSTEIN [7].

The positive formazan reaction, obtained in spite of strong alcalinity, could be explained above. The rise of formazan formation, on the other hand, can be explained by a shift of cell-surface-potential to a more negative value, in alcaline medium, favouring the uptake of TTC-cation.

The reduction of penetrated TTC could not be prevented in this way, using an aphysiological medium and on this basis we could not state definitely, whether the permeability of cell shows a sudden change about the 4th day of storage.

b) It has been attempted to solve the problem by applying, in place of TTC, another substance which, while structurally related to TTC, is not reduced

in the cell. For this purpose, "photo-TTC" appeared to be suitable. This compound differs from TTC only by the bond between phenyl groups 2 and 3, under loss of 2 hydrogen atoms:



To our surprise, this experiment showed that "photo-TTC" is not taken up in measurable quantities by fresh yeast or stored yeast, either. The determinations were carried out by the polarographic method evolved and published earlier by one of us [4].

c) Attempts to study the uptake of other dyes not reduced by yeast cells failed since none of the dyes applied were taken up by living yeast cells in measurable amounts, during storage. When, however, cells were poisoned by ether or by other methods, the uptake of dyes increased. These latter values could not serve as a basis for studying the problem we are facing with in case of living cells.

d) As the uptake of TTC could not be separated from other factors, an opposite way of investigation was attempted in that the penetration of TTC as a limiting factor was being eliminated. For this purpose, the determination of enzymatic activity, in place of incubating intact cells with TTC, was carried out in cell homogenates and LEBEDEW extracts, respectively, *i. e.* in structureless solutions. Furthermore it was attempted to raise the permeability by removing lipids, by treating the cell membranes with toluene.

Subsequent to a mild homogenization, no changes on cells were perceptible by microscopic examination. Presumably only the cell membranes suffered some damage and yeast preparations of this type showed much higher development of formazan than those with intact cells, as shown by Fig. 3. When, however, homogenization was conducted until cells were completely destructed, the reducing power of yeast entirely disappeared. Thus, damage to the cell wall or cell membrane considerably increased the ability of TTC to penetrate the cells. Much to our regret, it is not possible to eliminate in this way all obstacles of penetration. Protoplasm may similarly inhibit the penetration of TTC. The destruction of protoplasm would lead to the inactivation of dehydrogenases.

However, it can be stated from Fig. 3 that slight damage to the cells did not reduce the rapid rise of dehydrogenase activity on the 5th day, confirming thus that this rise is not due to changes in permeability. If an increased permeability were responsible for the observed rise, the increase in formation of formazans would be less in tests with damaged cells.

e) The problem could not be solved, either, by carrying out incubation with a solution saturated with toluene (Fig. 4). Although lipids of the surface layers were dissolved by toluene and by this way the penetration of TTC and the formation of formazan were promoted, lipids may represent not the sole obstacles to penetration. CURRIER and DAY [2] observed an increased development of formazan in yeast in the presence of benzene, ethylether, xylene and 1-octanol. Toluene was chosen in the present experiments since it was expected that this agent may simultaneously inhibit the multiplication of eventual bacterial contaminations as well. It is clearly visible in Fig. 4, showing experimental data obtained with toluene that the rise appears here too on the 4th

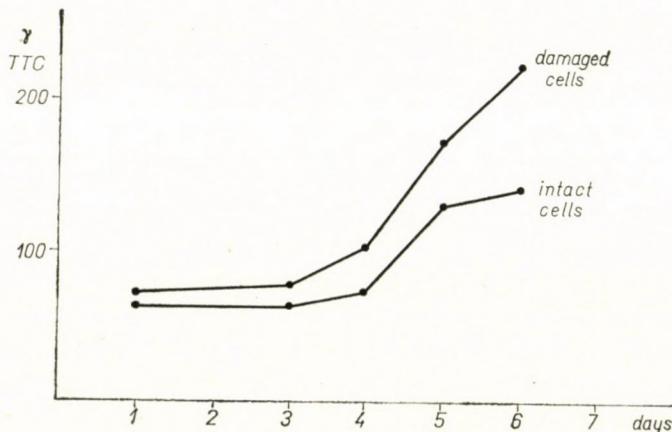


Fig. 3. Quantity of TTC reduced by 0.1 g of yeast, plotted against duration of storage. Intact baker's yeast and that slightly rubbed with sand were applied. Incubation at 37° C for 5 hours in the presence of  $10^{-2} M$  succinate

day, although parallels show appreciable variation, the causes of which are not discussed now. The fact that the rise of activity is perceptible even in the presence of toluene, seems to support the view that changes in permeability may not be the sole factors responsible for this rise. However, this is not satisfactorily convincing since there are no unequivocal arguments to prove that by using toluene, all hindrances of the penetration of TTC were eliminated.

f) Results obtained with LEBEDEW extracts are shown in Fig. 5. This series of tests was conducted parallel with those indicated in Fig. 3, with the same yeast. Measurable reduction was only observed with extract obtained from 2.5 g yeast. It is clearly visible that the rapid rise also appears in a completely homogeneous, cell-free solution when permeability cannot play any role. Thus, the actual rise of activity shown in Fig. 1 on the 4th—5th day of storage can be considered as an established fact, penetration playing only a minor role.

On comparing the data with those of Fig. 3, it appears that the obtained values of activity amount only to 1/20th of the former ones.

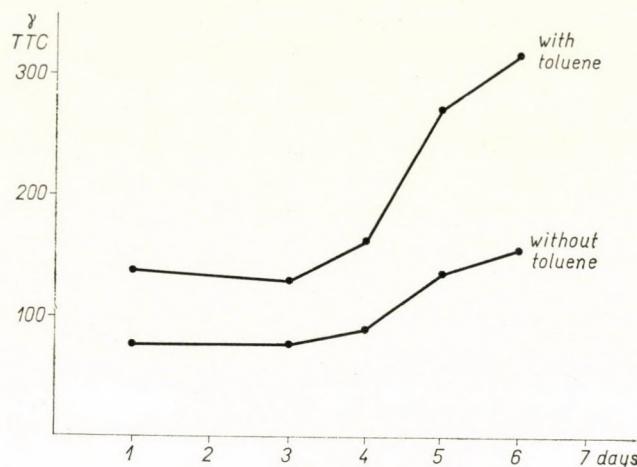


Fig. 4. Changes in the activity of dehydrogenases in baker's yeast during storage. In order to facilitate penetration, 0.4% of toluene was added to the incubation mixture

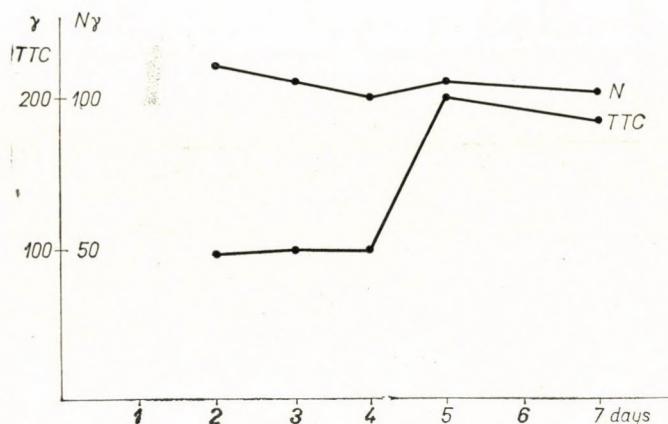


Fig. 5. Quantity of TTC reduced by LEBEDEW extracts prepared from yeast stored for various periods (extract of 2.5 g of yeast incubated for 6 hours in the presence of  $10^{-2} M$  succinate), and content of protein-N of extracts

g) The appreciable rise of activity from the 4th day on indicates significant biological changes. Therefore, it seemed to be of interest to examine whether spores are formed by the cells on the 5th day. Colour tests of yeast samples stored for 10–12 days, conducted with iron hematoxyline and phenol fuchsin and methylene blue did not detect any spores, quite in accordance with the literary data indicating that spores, only form in the superficial zone of yeast, exposed to air.

*Action of high concentrations of substrate*

We reported earlier [5] that incubation conducted in the presence of high concentrations of substrate ( $10^{-1} M$ ) suppress the dehydrogenase activity of pea roots. In certain cases, similar observations were made with yeast as well, whereas in other instances an increased development of formazan was perceptible. Differences in the behaviour of yeast are presumably due to the physiological state and to the duration of storage, respectively.

In the next series of tests, determinations were carried out with yeast samples stored for varying periods; incubation was conducted in the presence of  $10^{-2}$  and  $10^{-1} M$  substrate. The results are summarized in Table 1.

**Table 1**

*Effect of a high concentration of substrate on activity.  
Quantity of formazan, in micrograms, consumed by 0.1 g  
of yeast*

Substrate	Period of storage			
	3	4	5	11
	days			
$10^{-2}M$ succinate .....	188	172	460	260
$10^{-1}M$ succinate .....	206	212	60	66
$10^{-2}M$ aspartate .....	190	186	720	336
$10^{-1}M$ aspartate .....	308	342	420	305
$10^{-2}M$ lactate .....	202	234	340	220
$10^{-1}M$ lactate .....	150	400	480	240
$10^{-2}M$ ethanol .....	112	144	230	190
$10^{-1}M$ ethanol .....	78	80	170	230

It appears that in case of succinic and aspartic acids, a high substrate concentration enhances formazan formation in fresh yeast, and, respectively, inhibits it in stored yeast, similarly to pea roots.

It is striking, and presumably not due merely to chance, that the stimulating action turns just on the 4th—5th day to an inhibiting one, *i.e.* at the time when dehydrogenase activity shows a rapid rise.

In the case of lactic acid and ethanol the reversed process takes place in that a high substrate concentration acts first as an inhibiting factor and stimulates in later periods. The point of transition does not coincide here with those of the other substrates.

### Discussion

On surveying the present experimental results, the following conclusions can be drawn.

1. The activity of all dehydrogenases tested, measured by the standard method, showed appreciable rise on the 4th—5th day of storage, followed by a gradual decrease on further storage. In general, no measurable activity was observed on the 14th day.

2. The following observations support the assumption that this rapid rise is not due to changes in permeability:

a) The rise was also observed in a cell-free LEBEDEW extract,

b) Carrying out tests with slightly damaged cells, the rapid rise exceeded that observed with intact cells,

c) Although toluene facilitates the penetration of TTC the rise appeared even in the presence of toluene,

d) If exclusively or dominantly the change in permeability would be responsible for the rise in the degree of reduction of TTC, approximately identical rise should appear with all substrates. However, as Fig. 1 indicates, the rise ranged with succinate about 125% whereas with glutamic acid it amounted to 340%.

On considering the arguments in favour of the previously discussed assumptions, it seems justified to draw the conclusion that there is indeed an actual rise of activity. This, however, does not exclude the possibility of any changes in permeability as well, although these latter are of only secondary significance from the point of view of our results referring to enzymatic activity.

3. The inhibitory action of high concentrations of substrate takes place also on the 5th day. No rapid changes were observable, in turn, in rising power, and in spore formation, either.

4. On the basis of the action observed with toluene, penetration undoubtedly plays a role as a limiting factor in the measurement of dehydrogenase activity. It would be necessary to carry out measurements of activity in homogenates. However, at least in the given case, dehydrogenases turn practically ineffective when cell structures are destroyed. Values obtained with LEBEDEW extracts amount e. g. only to about 1/20th of those with intact cells, and the absolute values of the obtained results cannot be considered as a measure of dehydrogenase activity. In the present, tests, instead of absolute values, only the trend of the change was considered to be essential.

5. Rapid changes observed on the 5th day seem to be suitable for determining the freshness of stored yeast. It must be noted here that the period of rapid change depends to a great extent on the temperature of storage.

Further experiments are running to find the reason for the phenomena described: whether they are due to the yeast itself or to contaminating bacteria.

Thanks are due to Eng. B. KOVÁTS, Budapest Yeast Factory, for regularly supplying yeast, and to Miss KLÁRA KISBÁN and Mr. LÁSZLÓ NÉMÉDY for their technical assistance.

#### LITERATURE

1. BARRON, E. S. G., ARDAO, M. J., HEARON, M. (1950) Enzyme distribution in the cell; its influence on the metabolism of pyruvic acid by baker's yeast. *J. Gen. Physiol.*, **34**, 211—224.
2. CURRIER, H. B., DAY, B. E. (1954) The tetrazolium reaction in yeast. *Science*, **119**, 817.
3. JÁMBOR, B. (1954) Reduction of tetrazolium salt. *Nature*, **173**, 776.
4. JÁMBOR, B. (1958) Polarographische Untersuchung des Photoproduktes von Triphenyltetrazoliumchlorid. *Acta Chim. Hung.*, **15**, 27—34.
5. JÁMBOR, B., DÉVAY, M. (1959) Determination of the activity of plant dehydrogenase-systems by triphenyl tetrazolium chloride (TTC). *Acta Biol. Hung.*, **9**, 193—218.
6. JÁMBOR, B., ROBERTS, L. W., DÉVAY, M. (1958) Experiments on the penetration and reduction of 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride in plant tissues. *Phyton*, **10**, 89—98.
7. ROTHSTEIN, A. (1955) Relationship of the cell surface to electrolytic metabolism in yeast, In SHANES, A. M. *Electrolytes in biological systems*, Washington. 67—85.

#### VERÄNDERUNGEN IN DER DEHYDROGENASEN-AKTIVITÄT DER BÄCKERHEFE WÄHREND DER LAGERUNG

In Bäckerhefe steigt die Aktivität der 6, von uns untersuchten Dehydrogenasen-Systemen, während der Lagerung bei Zimmertemperatur am 4—5. Tage um 100—300%, danach folgt eine allmähliche Abnahme bei weiterer Lagerung.

Gleichfalls vom 4—5-Tag an üben grössere Konzentrationen gewisser Substrate eine Hemmende Wirkung auf die Dehydrogenasen-Systeme aus.

Diese Änderungen scheinen zur Abschätzung der Frischheit der Hefe geeignet zu sein.

#### ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕГИДРОГЕНАЗ ПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ В ПРОЦЕССЕ ХРАНЕНИЯ

В процессе хранения пекарных дрожжей при комнатной температуре, на 4—5-й день хранения активность изучаемых шести дегидрогеназных систем обнаруживает 100—300%-ое повышение, после чего в течение дальнейшего хранения отмечается постепенное снижение активности.

Подобным образом, начиная с 4—5-го дня хранения определенные субстраты в более высокой концентрации оказывают тормозящее действие на дегидрогеназы.

Вышеуказанные изменения кажутся подходящими для характеристики свежести дрожжей.

BÉLA JÁMBOR, Budapest, VIII. Múzeum krt. 4/a, Hungary.

MÁRTA DÉVAY, Martonvásár, Hungary.



# ÜBER DIE REGENERATION DER AUGENLINSE DES RIPPENMOLCHES (PLEURODELES WALTLII)

B. VIGH

INSTITUT FÜR HISTOLOGIE UND EMBRYOLOGIE DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST  
(VORSTAND: I. TÓRÖ)

(Eingegangen am 5. Oktober, 1959)

## Zusammenfassung

Nach Entfernung der Augenlinse sowohl der Larve als auch des ausgewachsenen Rippenmolches (*Pleurodeles waltlii*) ist Linsenregeneration zu beobachten, die der WOLFFSchen Augenlinsenregeneration entsprechend vom dorsalen Irisrand ausgeht. Der Verlauf der Neubildung gleicht der bei den *Triturus*-Arten wahrnehmbaren Augenlinsenregeneration. Nach eigenen Versuchen war jedoch die Regeneration bei *Pleurodeles waltlii* quantitativ besser als bei den *Triturus*-Arten, was mit den abweichenden ökologischen Verhältnissen der Arten zusammenhängen dürfte.

## Einleitung

Unter den Regenerationsfragen stellt die Regeneration der Augenlinse eines der interessantesten Probleme dar. Die von COLUCCI und WOLFF beschriebene Form der Linsenregeneration, wo sich die herausgenommene Linse vom dorsalen Irisrand ausgehend neu bildet, ist bereits an vielen Schwanzlurchen (Urodela) untersucht worden. Die umfangreichsten Kenntnisse besitzen wir über die Regeneration der *Triturus*-Arten; bei 14 dieser Arten kommt Regeneration vor [9].

Von den *Triturus*-Arten abgesehen, hat man Linsenregeneration an folgenden (nur am Embryo oder an der Larve) festgestellt: *Ambystoma punctatum* [1, 11], *Hynobius unnnangso* [9], *Ambystoma mexicanum* [13], *Salamandra salamandra* [4, 5, 10, 12], *Salamandra perspicillata* [14].

Die saisonbedingte Beschaffungsmöglichkeit und oft schwierige Züchtbarkeit der bisher untersuchten Arten sowie PASQUINIS [8] Versuche an Rippenmolchembryonen (*Pleurodeles waltlii*) haben uns veranlaßt, die Linsenregeneration dieser Art zu untersuchen.

## Material und Methoden

Bei den Versuchen benutzten wir insgesamt 80 Rippenmolche verschiedenen Alters. Vor Entfernung der Linse und während der Regeneration wurden die Tiere zweitägiglich mit Röhrenwürmchen (*Tubifex* sp.) gefüttert und in einem ventilirten, im Halbschatten stehenden Aquarium von Zimmertemperatur gehalten. Nach Herausnahme aus dem Aquarium wurden die Molche in ätherhaltigem Wasser narkotisiert und anschließend die Operation am linken Auge vorgenommen, während das andere als Kontrolle diente. Die Herausnahme der Augenlinse erfolgte mit Cornealschnitt. Nach Entfernung der Linse wurden die Tiere wieder

in das Aquarium gesetzt, und nach 2 Tagen fuhren wir mit ihrer Fütterung fort. (Die Cornea wurde mit einem abgebrochenen Stückchen einer scharfen Rasierklinge eröffnet, das wir in einen Nadelhalter einfaßten. Die Ränder der damit verursachten Wunde fügten sich nach Herausnahme der Linse sogleich lückenlos zusammen.)

Die Linsenentfernung erfolgte in drei Gruppen, an 2, 6 Monate alten und an ausgewachsenen Tieren. Die Molche wurden vom Tage nach der Operation bis zum 25. Tage in Intervallen von 2—4 Tagen durch Dekapitation nach Äthernarkose getötet.

Das Material wurde in Formalin, Bouin oder Susa Gemisch fixiert. Die Einbettung geschah nach PÉTERFI in Methylbenzoat-Celloidin-Paraffin. Die Schnitte waren  $7 \mu$  dick und wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Unsere Versuche gliederten wir nach SATOS Einteilung der WOLFFSchen Regeneration, laut welcher der Verlauf der Linsenbildung in folgende Stadien aufgeteilt werden kann:

1. Stadium: Verdickung der Iris, besonders am Pupillarrand.
2. Stadium: Weitere Verdickung des dorsalen Irisabschnitts und Spaltenbildung zwischen äußerer und innerer Platte.
3. Stadium: Erscheinen depigmentierter Zellen am Pupillarrand des mitteldorsalen Irisabschnitts.
4. Stadium: Bildung einer leeren Epithelblase, die aus kubischen depigmentierten Zellen besteht und die Fortsetzung der inneren und äußeren Epithelplatte der Iris darstellt.
5. Stadium: Die Zellen der inneren Blasenwand gestalten sich zu Zylinderepithel um.
6. Stadium: Aus der inneren Blasenwand bilden sich einige unregelmäßig angeordnete Linsenfasern.
7. Stadium: Die primären Linsenfasern sind an der inneren Wand hügelförmig angeordnet und zum Blasenzentrum gerichtet.
8. Stadium: Die primären Linsenfasern füllen das Blasenlumen aus.
9. Stadium: Die Bildung der sekundären Linsenfasern aus der Äquatorialzone kommt in Gang.
10. Stadium: Die primären Linsenfasern sind — lateral dünner als medial — von sekundären Fasern umgeben.
11. Stadium: Der Ring der sekundären Linsenfasern umgibt symmetrisch die primären Linsenfasern.
12. Stadium: Die Zellkerne verschwinden aus den primären Linsenfasern.
13. Stadium: Den äußersten Teil der sekundären Linsenfasern ausgenommen, sind die Kerne überall verschwunden. Die neue Linse schnürt sich von der Iris ab.

### Ergebnisse

Die Untersuchung der 2 Monate alten Larven (I. Versuchsgruppe) ergab folgendes:

Die Cornealwunde schließt sich in den ersten 3 Tagen nach der Operation. Die mit dem Rasierklingensplitter verursachte Wunde heilt mit einer viel kleineren Narbe, als wenn die Wunde mit dem GRAEFESCHEN Messer oder mit einer Glasnadel herbeigeführt wird. Da auch die Herausstülpung der Linse leichter erfolgt, findet man in diesem Fall auch keine von der Cornealwunde in das Augeninnere verlaufende Faserbündel des Bindegewebes. Am 4.—8. Tage ist die Depigmentation des dorsalen Irisrandes und Spaltenbildung zwischen den beiden Platten der Iris zu beobachten (Abb. 1, 2 und 3). Dieses Bild fanden wir in der Hälfte der Fälle bei den am 5. Tage getöteten Tieren, in den übrigen Fällen am 4., 7. und 8. Tage.

Am 9.—13. Tage nach der Operation bildet sich am Irisrand eine Epithelblase; (am 9. und 11. Tage getötete Tiere) (Abb. 4). Die Innenwand der Blasen verdickt sich, die Zellen strecken sich hier und werden zylindrisch (13. Tag) (Abb. 5).

Zwischen dem 14. und 17. Tage waren die Zellen des Linsenhügels in 1/3 der Fälle verlängert, in 2/3 der Fälle waren mehr oder weniger primäre Linsenfasern anzutreffen (Abb. 6, 7 und 8).

Am 18.—20. Tage nach der Operation bilden sich sekundäre Linsenfasern um den Linsenkern, die anfangs teilweise an der Äquatorialzone die dicksten, am 20. Tage jedoch in allen Fällen in gleichmäßiger Dicke die primären Linsenfasern umgeben (Abb. 9, 10 und 11).

Am 22. und 25. Tage sahen wir das Verschwinden der Fasernkerne (Abb. 12) und die Abschnürung der Linse.

Die (6 Monate alten) Tiere der II. Gruppe zeigten ein dem obigen entsprechendes Bild. Es waren lediglich folgende Unterschiede zwischen der I. und II. Gruppe wahrzunehmen: Das Auge der älteren Larve ist größer, ihre Iris differenzierter. Dementsprechend ist die sich entwickelnde Linse proportional größer, während die Entwicklung der ersten drei Stadien an der verhältnismäßig dünneren Iris deutlicher, besser beobachtet werden kann.

Wesentliche Unterschiede fanden wir bei den ausgewachsenen Tieren (III. Gruppe), wo die Schließung der Cornealwunde ähnlich wie bei den Larven vor sich geht, die Depigmentation des Irisrandes jedoch erst bei den am 6. und 9. Tage getöteten Tieren angetroffen werden kann. Die Spaltenbildung zwischen den beiden Irisplatten ist am 9. bzw. 11. Tage wahrnehmbar. Die aus kubischen Epithelzellen bestehende Epithelblase erscheint am 12. bzw. 15. Tage nach der Operation. Sonst stimmt das Bild mit dem bei den Larven beschriebenen überein.

In den ersten beiden Gruppen (2 und 6 Monate alte Larven) kam es in allen Fällen zur Regeneration der herausgenommenen Augenlinse. Bei den ausgewachsenen Tieren (III. Gruppe) haben wir Regeneration nur in einem Falle nicht gefunden. Der Irisrand war hier mit der Cornealwunde verwachsen.

### Besprechung

Wie wir gesehen haben, regeneriert die Augenlinse des Rippenmolches (*Pleurodeles waltlii*) nach ihrer Entfernung. Die Regeneration aus dem dorsalen Irisrand findet ganz auf die von WOLFF und COLUCCI beschriebene Weise statt. Die an den Larven am 4. bzw. 8. Tage wahrnehmbare Depigmentation des dorsalen Irisrandes und Spaltenbildung zwischen den Irisplatten entspricht dem 2.—3. Stadium der WOLFFSchen Regeneration nach der SATOSchen Einteilung. Die am 9. bzw. 13. Tage am Irisrand vorgefundene Epithelblase und die Verdickung der inneren Blasenwand stimmen mit dem 4. und 5. Stadium der SATOSchen Einteilung überein. Die am 14. und 17. Tage nach der Linsenentfernung sichtbaren primären Linsenfasern bedeuten das 6., 7. und 8. Stadium. Die am 18.—20. Tage wahrnehmbaren sekundären Linsenfasern sowie deren



Abb. 1. Verdickung des dorsalen Pupillarrandes der Iris

Abb. 2. Spaltenbildung zwischen den beiden Platten der dorsalen Iris

Abb. 3. Erscheinen depigmentierter Zellen am Pupillarrand des mitteldorsalen Irisabschnitts



4



5

Abb. 4. Bildung einer leeren Epithelblase, die aus kubischen, depigmentierten Zellen besteht

Abb. 5. Die Zellen der Blasenwand werden zylindrisch

Abb. 6. Von der inneren Blasenwand bilden sich einige unregelmäßig angeordnete Linsenfasern



6

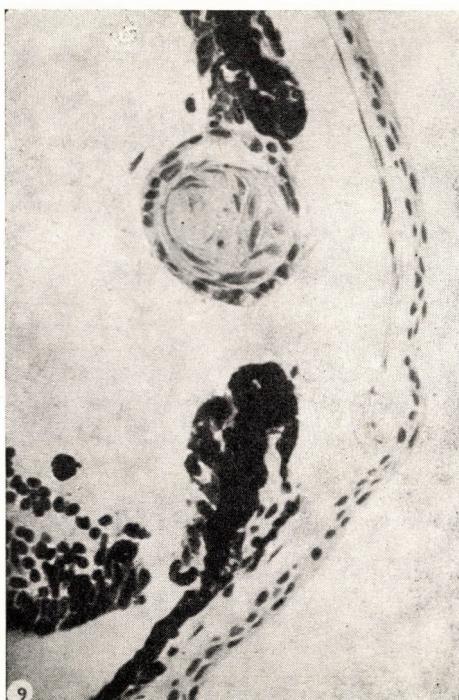
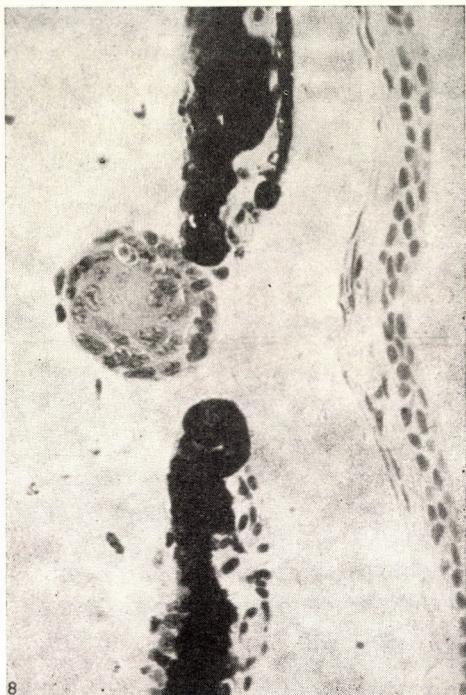


Abb. 7. Die primären Linsenfasern an der Innenwand liegen hügelförmig

Abb. 8. Die primären Linsenfasern füllen das Blasenlumen aus

Abb. 9. Die Bildung sekundärer Linsenfasern aus der Äquatorialzone hat begonnen

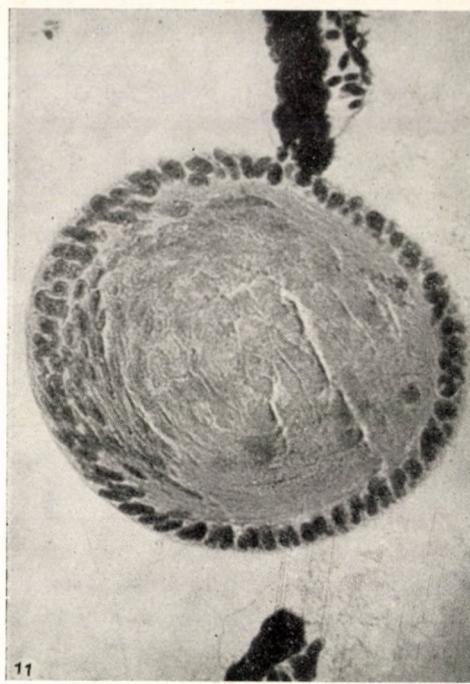


Abb. 10. Die primären Linsenfasern sind von sekundären Fasern umgeben

Abb. 11. Die primären Linsenfasern sind symmetrisch von sekundären Linsenfasern umgeben

Abb. 12. Der Zellkern verschwindet aus primären Linsenfasern



Anordnung um die primären Fasern entsprechen dem 9. und 10. Stadium, die am 20.—25. Tage verschwindenden Fasernkerne und die Linsenabschnürung dem 11.—13. Stadium der WOLFFSchen Regeneration.

Die einzelnen Stadien erscheinen zur gleichen Zeit wie bei der Augenlinsenregeneration der *Triturus*-Arten.

Bei den ausgewachsenen Tieren trat das 1. Stadium erst am 6. bzw. 8. Tage in Erscheinung; das 2. zwischen dem 9. und 11., das 3. am 12.—15. Tage. Die weiteren Stadien erschienen zum gleichen Zeitpunkt wie bei den Larven. Die Regeneration kam also bei den ausgewachsenen Molchen später in Gang, d. h. die auf die Operation folgende Latenzperiode war länger. Dies wurde bei den *Triturus*-Arten auch von anderen Autoren beschrieben [9, 11], welche die Erscheinung ebenso wie wir darauf zurückführen, daß die ausgewachsene — differenziertere — Iris längerer Zeit bedarf, um die zur Regeneration nötige Differenzierung zu erreichen.

Einen Unterschied zwischen der Regeneration am *Pleurodeles* und an den *Triturus*-Arten haben wir nur insofern beobachtet, als die Neubildung der Augenlinse des *Pleurodeles* trotz der in einigen Fällen bei der Operation entstandenen Einblutung beinahe ausnahmslos zustande kam, während die Regeneration bei den *Triturus*-Arten nicht in 100% der Fälle eintritt.

Da die Linsenregeneration bei *Pleurodeles* der der *Triturus*-Arten gleicht, ist der Rippenmolch zur Untersuchung der WOLFFSchen Regeneration vorzüglich geeignet. In dieser Beziehung hat er den anderen Arten gegenüber den beachtenswerten Vorteil der leichteren Züchtung und Haltung im Laboratorium. Die Fortpflanzung der *Triturus*-Arten ist ziemlich schwierig. Sie können jährlich einmal, höchstens zweimal befruchtet werden, *Pleurodeles waltlii* hingegen zu einem beliebigen Zeitpunkt, auch mehrmals im Laufe des Jahres. Beim Einfangen der *Triturus*-Arten muß man außerdem mit der Wirkung der eingetretenen Umweltveränderung rechnen, während wir aus den Rippenmolchen in unveränderter Umgebung Standardstämme züchten können.

Die Tatsache, daß die Linsenregeneration am *Pleurodeles* quantitativ besser erfolgt als bei den *Triturus*-Arten, beruht unseres Erachtens auf der Verschiedenheit der ökologischen Verhältnisse beider Arten. Die Frage, welche ökologischen Faktoren hierfür verantwortlich sind, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

#### LITERATUR

1. BECKWITH, C. J. (1927) The effect of the extirpation of the lens rudiment on the development of the eye in *Ambystoma punctatum*, with special reference to the choroid fissure. *J. exp. Zool.*, **49**, 217—259.
2. CIACCIO, G. (1936) Nuove ricerche e nuovi problemi sulla rigenerazione del cristallino degli anfibi urodeli adulti. *Monit. zool. ital.*, **45**, 295—298.
3. DINNEAN, F. L. (1942) Lens regeneration from the iris and its inhibition by lens reinplantation in *Triturus torosus* larvae. *J. exp. Zool.*, **90**, 461—478.

4. FISCHEL, A. (1903) Weitere Mitteilungen über die Regeneration der Linse. *Arch. Entw. Mech. Org.*, **15**, 1—138.
5. FISCHEL, A. (1900) Über die Regeneration der Linse. *Anat. Hefte*, **14**, 1—256.
6. MONROY, A. (1937) Über die Linsenregeneration bei Urodeilen verschiedenen Alters, unter besonderer Berücksichtigung der Metamorphose. *Arch. Entw. Mech. Org.*, **137**, 25—33.
7. OGAWA, C. (1921) Experiments on the regeneration of the lens in *Diemyctylus*. *J. exp. Zool.*, **33**, 395—407.
8. PASQUINI, P. (1927) Sul trapianto dell'occhio nei vertebrati. *Riv. Biol.*, **9**, 515—524.
9. REYER, R. W. (1954) Regeneration of the lens in the amphybian eye. *Quart. Rev. Biol.*, **29**, 1—46.
10. SATO, T. (1930) Beiträge zur Analyse der WOLFFSchen Linsenregeneration. I. *Arch. Entw. Mech. Org.*, **122**, 451—493.
11. SPERLING, F. (1943) Extra-epidermal and supernumerary lenses in association with cyclopean eyes in *Ambystoma* embryos. *Anat. Rec.*, **85**, 413—425.
12. STONE, L. S. (1952) An experimental study of the inhibition and release of lens regeneration in adult eyes of *Triturus viridescens viridescens*. *J. exp. Zool.*, **121**, 181—223.
13. TÖRÖ, I. (1932) Die Regeneration der Linse in früheren Entwicklungsstadien bei *Ambystoma mexicanum*. *Arch. Entw. Mech. Org.*, **126**, 185—206.
14. WACHS, H. (1914) Neue Versuche zur WOLFFSchen Linsenregeneration. *Arch. Entw. Mech. Org.*, **39**, 384—451.
15. WOERDEMAN, M. W. (1922) Über Linsenextirpation bei Grasfroschlarven. *Arch. Entw. Mech. Org.*, **51**, 625—627.
16. WOLFF, G. (1894) Bemerkungen zum Darwinismus mit einem experimentellen Beitrag zur Physiologie der Entwicklung. *Biol. Zbl.*, **14**, 609—620.

#### REGENERATION OF CRYSTALLINE LENS IN PLEURODELES WALTLII

The removal of the crystalline lens from both larvae and adults of *Pleurodeles waltlii* was observed to have been followed by a typical Wolffian lens regeneration starting at the dorsal margin of the iris. The course of the process is similar to that observed in newts. Regeneration proved in our experiments with the *Pleurodeles waltlii* to be quantitatively superior to that observed in newts. The difference is presumably due to oecologic factors.

#### РЕГЕНЕРАЦИЯ ХРУСТАЛИКА ТРИТОНА PLEURODELES WALTLII

После удаления хрусталика личинки или взрослого тритона *Pleurodeles waltlii* наблюдается регенерация хрусталика, происходящая соответственно регенерации хрусталика по Вольфу с дорсального края радужной оболочки. Процесс регенерации подобен наблюдаемой у видов *Triturus* регенерации хрусталика. Автор считает, что регенерация у вида *Pleurodeles waltlii* в количественном отношении лучше регенерации у видов рода *Triturus*. По его мнению данное обстоятельство связано с отклоняющимися экологическими условиями этих видов.

BÉLA VIGH, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58., Ungarn.





# HERZSTUDIEN

## III. HISTOLOGISCHE UND HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AM HERZEN VON ABRAMIS BRAMA

ANGELA T. GYÉVAI

INSTITUT FÜR HISTOLOGIE UND EMBRYOLOGIE DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, BUDAPEST  
(VORSTAND: I. TÖRÖ)

(Eingegangen am 3. November 1959)

### Zusammenfassung

Im Herzen von *Abramis brama* verlaufen vom Sinus venosus durch die Vorhofmitte bis zur atrioventrikulären Grenze Muskelbündel, die histologisch vom Arbeitsmuskel des Herzens abweichen. Dieselben Muskelfasern finden sich auch im atrioventrikulären Trichter. Diese Muskelfasern bilden das Reizleitungs- und Reizbildungssystem im Herzen des Bleis. Nach den durchgeführten histochemischen Reaktionen unterscheidet sich das Reizleitungssystem nicht vom Herzarbeitsmuskel. Allein die Bernsteinsäuredehydrogenase-Reaktion zeigt eine Abweichung zwischen den beiden Muskelfasern. Die Bernsteinsäuredehydrogenase-Reaktion des Herzarbeitsmuskels ist stärker als die der Reizleitungsfasern. Diese Differenz stimmt mit den an Säugern festgestellten Ergebnissen überein.

### Einleitung

Aus den Untersuchungen von SCHIEBLER [3, 4] und CARBONELL [1] wissen wir, daß sich das automatische Reizbildungs- und Reizleitungssystem im Herzen der Säuger nicht nur histologisch, sondern auch histochemisch vom Arbeitsmuskel des Herzens unterscheidet. Es ergibt sich die Frage, ob diese Eigenschaft des Wirbeltierherzens nur bei den Säugern oder auch bei den phylogenetisch auf niedrigerer Stufe stehenden Wirbeltieren in irgendeiner Form angetroffen werden kann. Im Zusammenhang damit haben wir bereits in einer früheren Arbeit festgestellt, daß das im Herzen der höheren Wirbeltiere vorhandene Reizbildungs- und -leitungssystem im Herzen des Kammolches (Amphibia, Urodela) noch nicht anwesend ist. Gegenüber den Verhältnissen bei den Schwanzlurchen ist die Literaturangabe interessant, daß das Herz der Knochenfische ein morphologisch vom Herzarbeitsmuskel abweichendes Reizbildungs- und Reizleitungssystem enthält. Histochemische Angaben über das Reizleitungssystem im Herzen der Fische haben wir in der Literatur nicht gefunden. Über die unsseits untersuchte Art sind in der Literatur weder histologische noch histochemische Angaben anzutreffen. Unsere Resultate sollen hier auch mit den Befunden verglichen werden, die an anderen Arten gewonnen wurden. Damit wollen wir vor allem einen Beitrag zur Lösung des Problems der Entwicklung des Reizbildungs- und Reizleitungssystems liefern.

### Material und Methoden

Das Versuchsmaterial stammt von den im September 1957 aus dem Balaton gefangenen *Aramis brama*-Exemplaren (Pisces, Teleostei). Nach dem Fang wurden die Fische sogleich getötet, die Herzen herausgenommen und fixiert. Als Fixiermittel benutzten wir 4%iges Formal, gesättigten pikrinsäurehaltigen Alkohol, Alkohol, Azeton, weiterhin Susa und CARNOY-sches Fixiergemisch. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin, Eisenhämatoxylin, nach VAN GIESON, MALLORY und mit Azan gefärbt. Die Methylenblaufärbung erfolgte nach CARLCOUTELLA, die Silberimprägnation nach BIELSCHOWSKY-GROSS (in der Modifikation von GAIRNS und GARVEN). Folgende histochemische Verfahren kamen zur Anwendung: DNA-Nachweis (FEULGEN, Methylgrün-Pyronin), Glykogen-Nachweis (PAS), saures Mukopolysaccharid nach STEDMAN, allgemeiner Eiweißnachweis (Tetrazon-Reaktion), Lipid-Nachweis (LILLIE), Plasmal-Nachweis (HAYES), alkalische und saure Phosphatase (GÖMÖRI), Bernstein-säuredehydrogenase (NTC), Neotetrazolumchlorid und Cholinesterase (GEREBTZOFF).

### Ergebnisse

Wie aus Literaturangaben bekannt [5], besteht das Herz des Bleis aus dem Sinus venosus, einem Vorhof, einer Kammer und dem sich anschließenden bindegewebigen Truncus. Außen sind sämtliche Herzabschnitte vom Epikard umschlossen, das histologisch aus bindegewebigen Fasern und Mesothelzellen besteht. Das Mesothel lässt sich hauptsächlich im Bereich des Sinus venosus und Vorhofs gut beobachten. Im ganzen Epikardgebiet finden sich verschieden dicke Nervenfasern. Das Myokard besteht aus quergestreiften Muskelfasern, an denen die EBERTHSchen Linien deutlich zu sehen sind. An der Außenseite der Kammer bilden die Muskelfasern, miteinander verwoben und einander kreuzend, eine Muskelschicht von kompakterer Struktur. Darunter befindet sich die spongiöse Struktur aufweisende Kammermuskulatur. In der Vorhofwand ist ein derartiger struktureller Unterschied nicht zu sehen. Die eigentliche Höhle der Kammer ist sehr klein und ihre Oberfläche von Endokard bedeckt, das aus flachen Zellen besteht. Die Vorhofmuskulatur enthält dünnerne Fasern als die Kammermuskulatur. Vom Sinus venosus verlaufen durch die Vorhofmitte, dem embryonalen Herzrohr entsprechend, vom Arbeitsmuskel des Herzens morphologisch abweichende Muskelbündel, die über die atrioventrikuläre Grenze in die Kammer eintreten (Abb. 1 und 2). Diese Muskelbündel dürften dem Reizleitungssystem der höheren Wirbeltiere (Säuger) entsprechen. Nach den mit normalen histologischen Verfahren (H.—E., VAN GIESON, Eisenhämatoxylin, MALLORY, Azan) hergestellten Schnitten unterscheidet sich dieses Gebiet in folgender Weise vom Arbeitsmuskel des Herzens:

Die Fasern sind dünner, sie verlaufen wellig, ihre Querstreifung ist schwächer. Zwischen ihnen befinden sich viele kollagene Fasern sowie zahlreiche erweiterte Kapillaren. An der Sinus-Vorhofgrenze befindet sich ein intrakardiales Ganglion. Ebenso sind auch einzelne Nervenzellen verstreut im Bereich der speziellen Muskelbündel vorzufinden. In dem sich der Kammer anschließenden Truncus befinden sich keine Muskelemente, seine Wand besteht aus kollagene Faserbündeln. An der Kammer-Truncusgrenze ist ebenso wie an der atrioven-

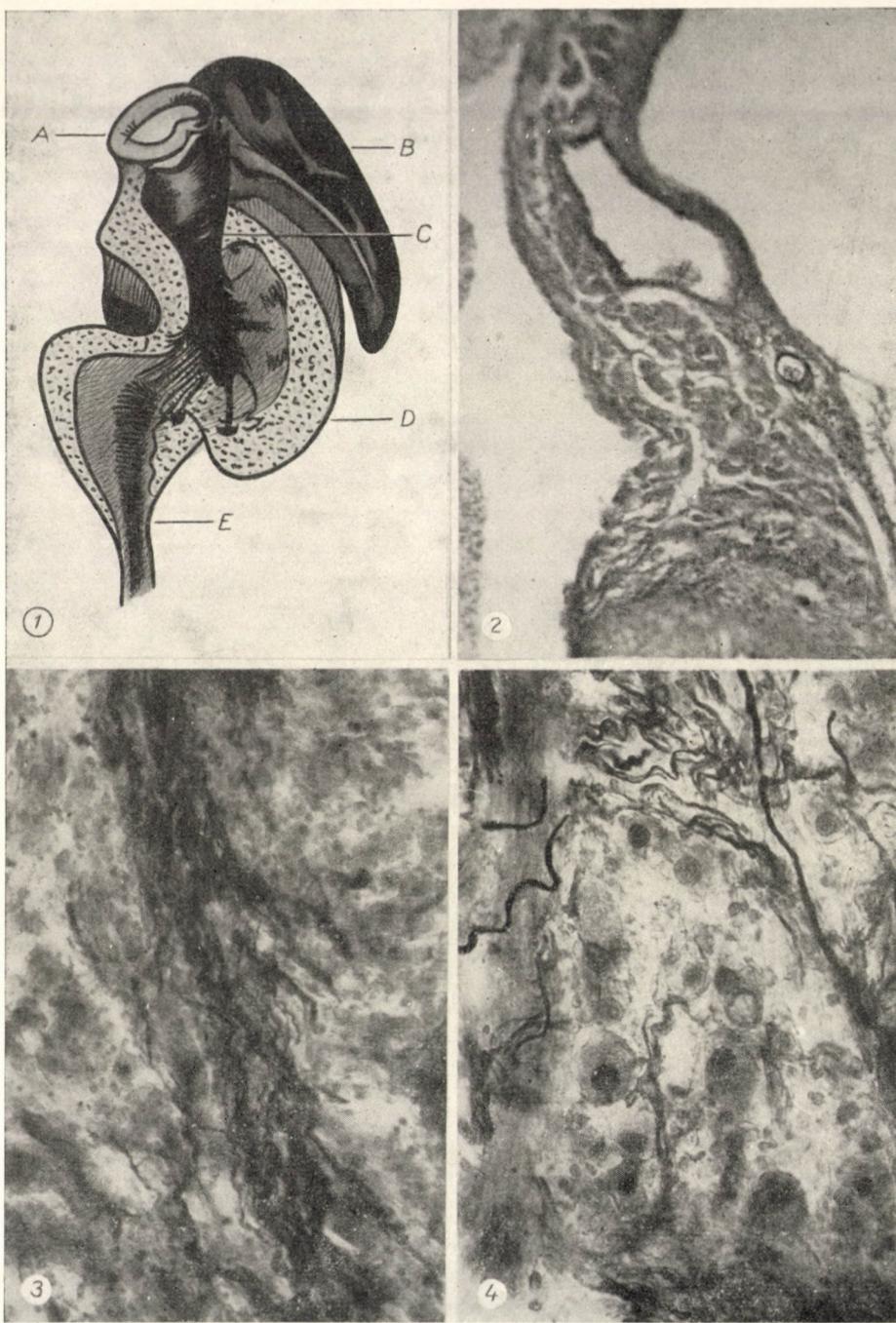


Abb. 1. Längsschnitt des Herzens von *Abramis brama*. A — Sinus venosus, B — linker Vorhof

C — Vorhof-Kammer Grenze, D — Kammer, E — Truncus arteriosus. Vergrößerung 5×

Abb. 2. Vom Vorhof zur Kammer verlaufendes Leitungsbündel. H.—E. Vergrößerung 400×

Abb. 3. Reichhaltiges Nervenfasernetz längs der Leitungsfasern. Silberimprägnation. Ver-

größerung 400×

Abb. 4. Intrakardiales Ganglion an der Sinus-Vorhofgrenze. Silberimprägnation. Vergrößerung 400×

trikulären und an der Vorhof-Sinusgrenze eine bindegewebige Klappe anwesend. An der atrioventrikulären Grenze sieht man in Serienschnitten deutlich die ungefähr gleichmäßig entwickelten 4 Endokardkissen. Diese Gebiete treten hauptsächlich bei der Färbung nach MALLORY und mit Azan deutlich hervor.

### *Silberimprägnation*

Wir setzten voraus, daß die extrakardialen Nerven ebenso wie bei den Säugern auch hier mit den speziellen Muskelbündeln im Zusammenhang stehen. In den Schnitten sind die Nervenelemente tatsächlich in diesen Zonen anzutreffen. Ein großes intrakardiales Ganglion befindet sich an der Sinus-Vorhofgrenze, von der ein reichhaltiges Nervenfasernetz den speziellen Muskelbündeln entsprechend durch den atrioventrikulären Trichter in die Kammer verläuft. Zwischen den Nervenfasern sind verstreut Nervenzellen anwesend. In der Kammer sieht man sehr dünne Nervenfasern, die zwischen den Muskelfasern verschwinden (Abb. 3 und 4).

### *Histochemische Untersuchungen*

**DNS-Nachweis.** In den Kernen der Muskelfasern, der Erythrozyten sowie der Zellen des die Muskelfasern umgebenden Bindegewebes kommt positive FEULGEN-Reaktion zustande. Die Kerne der Erythrozyten und Bindegewebszellen geben bereits nach 4–5 Minuten Salzsäurehydrolyse positive FEULGEN-Reaktion, während die Muskelfasernkerne erst nach 6–7 Minuten dauernder Behandlung und auch dann blasser zu sehen sind. Die Kerne der erwähnten Gebilde zeigen eine massivere, die der Muskelfasern hingegen eine lockerere Struktur (open-face-Kerne). Die in den Kernen der Muskelfasern sichtbare Reaktion ist einheitlich, auch die Kerne der erwähnten speziellen Muskelbündel, der vorausgesetzten Leitungsfasern, zeigen keine Abweichung. Nach Methylgrün-Pyroninfärbung ist kein Unterschied in der Reaktion des Herzarbeitsmuskels und des hypothetischen Leitungssystems zu beobachten. An der Sinus-Vorhofgrenze sieht man deutlich die Ganglienzellen mit ihrem stark pyroninophilen Plasma.

**Glykogen-Nachweis.** Die Muskelfasern geben stark PAS-positive Reaktion, während die Reaktion in den mit Schleimverdauung behandelten Kontrollschnitten nicht zustande kam. Bei der PJS-positiven Substanz handelt es sich demnach um Glykogen, das charakteristischerweise im allgemeinen weniger stabil ist und leichter herausgelöst werden kann als aus den Herzmuskelfasern der höheren Lebewesen. In den Querschnitten sieht man das Glykogen in Form von Granula, in Längsschnitten dagegen in Streifen (Abb. 5). Nach subjektiver Beurteilung der Reaktion enthalten die speziellen Muskelbündel und die Fasern des Herzarbeitsmuskels dieselbe Glykogenmenge. Der Truncus gibt PAS-positive



Abb. 5. Glykogen in den Muskelfasern der Kammer. PAS-Reaktion.  
Vergrößerung 80×

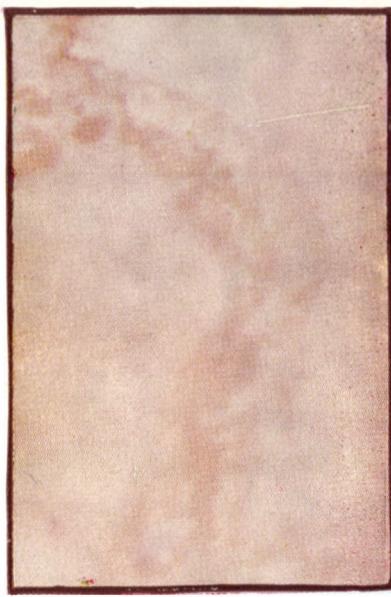


Abb. 6. Tetrazonium-Reaktion in dem vom Vorhof zur Kammer verlaufenden Muskelbündel. Blue B.  
Vergrößerung 40×

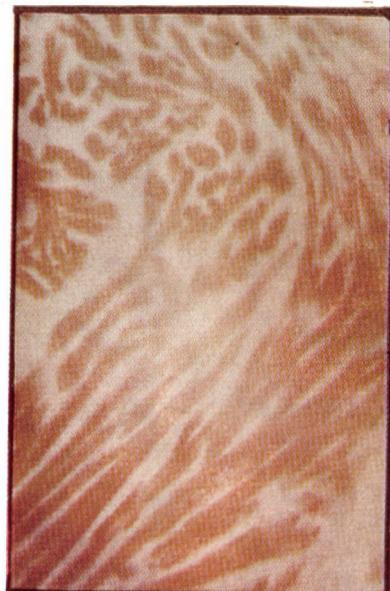


Abb. 7. Tetrazonium-Reaktion in der Kammermuskulatur. Blue B. Vergrößerung 40×



Abb. 8. Bernsteinsäuredehydrogenase-Reaktion an der atrioventrikulären Grenze. Oben die Kammermuskulatur, unten die Muskulatur des atrioventrikulären Trichters. NTC. Vergrößerung 80×



Reaktion, worauf wir noch zurückkommen werden. Unter den im Vorhof und in der Kammer zurückgebliebenen Erythrozyten befinden sich Zellen, die stark PAS-positive Reaktion zeigen. Die PJS-positive Substanz sieht man in Form von Granula im Plasma der Zellen. Auch in den der Schleimverdauung ausgesetzten Schnitten fällt die Reaktion positiv aus.

*Eiweiß-Nachweis.* Mit Tetrazoniumsalz (Blue B) kommt in den Muskelfibrillen entsprechenden Zone positive Reaktion zustande, die im allgemeinen schwach ist. Die Schnitte zeigen ein homogenes Bild, ein Unterschied zwischen den beiden verschiedenen Muskelfasern ist nicht zu sehen (Abb. 6 und 7).

*Lipid-Nachweis.* Die im Perikard anwesenden Fettzellen geben mit Oil Red 0 ausgeprägt positive Reaktion. Im Plasma der Muskelfasern sieht man eine Reaktion in Form kleiner Granula, die sich im allgemeinen in der Nähe des Kerns befinden. Auch die Muskelbündel, welche die Leitungsfasern enthalten, geben positive Reaktion. Nach subjektiver Beurteilung enthalten diese Fasern etwas weniger und kleinere positive Granula. Im Truncus fiel die Reaktion negativ aus. Positive Reaktion gab auch das Plasma der Erythrozyten. Sehr deutlich sieht man die stark homogene Reaktion gebenden Nervenfasern im Bereich des Sinus venosus.

*Saure Mukopolysaccharide.* Zwischen den Muskelfasern sieht man eine blasse Reaktion, die wahrscheinlich von den hier anwesenden Bindegewebsfasern stammt. Eine stärkere Reaktion geben die bindegewebigen (kollagenen) Truncusfasern.

*Plasmal-Reaktion.* Positive homogene Reaktion ist im ganzen Herzgebiet zu beobachten. Das Bild der Reaktion stimmt mit dem im Herzarbeitsmuskel und in dem die speziellen Leitungsfasern enthaltenden Muskelringgebiet wahrnommenen überein.

### Enzymreaktionen

*Saure und alkalische Phosphatasereaktion.* Die saure Phosphatasereaktion fiel sowohl im Herzarbeitsmuskel als auch im Bereich der speziellen Muskelbündel negativ aus. Die alkalische Phosphatasereaktion gab im ganzen Herzbereich blasse Schwarzfärbung. Diese Färbung erschien aber auch in den Kontrollschnitten, so daß sie als eine unspezifische Reaktion angesehen werden kann. Stark positive Reaktion gab hingegen das die Kammer auskleidende Endothel.

*Bernsteinsäuredehydrogenase-Reaktion mit NTC.* Der Truncus gab negative, der Vorhof schwach positive, die Kammer jedoch sehr stark positive Reaktion. Schwach war auch die Reaktion des Muskelbündels, das die speziellen Muskelbündel enthält und vom Sinus venosus über den Vorhof in die Kammer verläuft (Abb. 8).

*Cholinesterase.* Positiv fiel nur die Reaktion der Nervenelemente aus. Die Fasern der speziellen Muskelbündel gaben ebenso wie der Herzarbeitsmuskel negative Reaktion.

### Besprechung

Wie aus den Untersuchungen von SCHIEBLER [3, 4] und CARBONELL [1] hervorgeht, unterscheidet sich das Reizbildungs- und Reizleitungssystem im Herzen der Säuger nicht nur morphologisch, sondern auch — wie verschiedene histochemische Reaktionen zeigten — physiologisch vom Herzarbeitsmuskel. Die Unterschiede lenken, da sie vor allem in den Enzymreaktionen zutage treten, die Aufmerksamkeit auf den Stoffwechsel des Leitungssystems, der von dem des Herzmuskels abweicht. Eigene frühere Untersuchungen am Herzen des vollentwickelten Kammolches ergaben, daß bei diesen Tieren kein morphologisch vom Herzmuskel abweichendes Reizbildungs- und -leitungssystem anzutreffen ist [2]. Auf Grund der vorgenommenen histochemischen Reaktionen dürfen wir feststellen, daß auch diese das System nicht signifikant anzeigen. Die Mehrzahl der bei den Säugern vorkommenden Reaktionen fehlt entweder ganz, oder wenn nicht, so fallen sie im ganzen Herzbereich in gleicher Weise positiv aus. Die am Herzen von Abramis brama nach denselben Methoden vorgenommenen Untersuchungen ergaben noch interessantere Resultate. Theoretisch wäre zu erwarten, daß das Herz der Knochenfische weder morphologisch noch in histochemischer Beziehung ein differenzierteres Reizbildungs- und Reizleitungssystem enthält als das der Amphibien, speziell der Molcharten. Demgegenüber besitzen die Knochenfische nach Literaturangaben und eigenen Feststellungen ein morphologisch differenzierbares Reizleitungssystem. Auch die histochemischen Reaktionen führten zu interessanten Ergebnissen.

Die Leitungsfasern im Herzen der höheren Lebewesen enthalten mehr Glykogen, das sich bei verschiedenen Einwirkungen (Behandlung mit dest. Wasser, Schleimverdauung) stabiler erweist. Dagegen ist die Reaktion der basischen Eiweiße im Reizleitungssystem weniger positiv. Ebenso ist eine schwächere positive Reaktion in den Leitungsfasern beim Nachweise von neutralem Fett wahrnehmbar. Die Plasmalreaktion im Herzen der Säuger ergibt überall gleichmäßig positive Resultate. Was die Enzymreaktionen anlangt, so fällt die saure Phosphatasereaktion im ganzen Herzgebiet positiv, die alkalische Phosphatasereaktion im ganzen Herzbereich negativ aus. Die Cholinesterasereaktion ist sowohl in den Nervenelementen als auch in den nodösen Leitungsfasern positiv. Die Bernsteinsäuredehydrogenase-Aktivität ist im Reizleitungssystem schwächer als im Arbeitsmuskel des Herzens.

Im Herzen der Bleie ist Glykogen überall in gleicher Menge, aber — wie wir gesehen haben — in weniger stabiler Form anwesend als im Säugerherzen. Die basische Eiweißreaktion zeigt im ganzen Herzgebiet gleiche Positivität, ebenso wie der Lipidnachweis mit Oil Red 0. Unter den Enzymreaktionen fällt die saure und alkalische Phosphatasereaktion negativ, die Cholinesterasereaktion nur im Bereich der Nervenfasern und Nervenzellen positiv aus. Bernsteinsäuredehydrogenase ist auch hier in den speziellen Muskelfaszikeln in geringerer Menge

als im Herzarbeitsmuskel anwesend. Der besseren Übersichtlichkeit wegen haben wir folgende Tabelle 1 zusammengestellt:

**Tabelle 1**  
*Histochemische Eigenschaften der Muskelfaser des Herzens*

Angewandte histochemische Verfahren	Säuger		Blei	
	Leitungs- fasern	Arbeits- muskel	Leitungs- fasern	Arbeits- muskel
PJS-Reaktion Glykogen-Nachweis .....	++	+	+	+
Blue B Eiweiß-Nachweis .....	+	++	+	+
Oil Red O-Färbung Allgemeiner Lipid-Nachweis .....	+	++	+	+
Plasmal-Reaktion Azetalphosphatid-Nachweis .....	+	+	+	+
Gömöri Reaktion saure Phosphatase .....	+	+	—	—
alkalische Phosphatase .....	—	—	—	—
Gerebtzoffscher Cholinesterase-Nachweis .....	+	—	—	—
Bernsteinsäuredehydrogenase-Nachweis mit Neotetrazolium .....	+	++	+	++

Nach unseren Untersuchungsergebnissen enthält demnach das Herz der Bleie ein morphologisch deutlich wahrnehmbares Reizleitungssystem. Zugleich zeigen die histochemischen Reaktionen, die Bernsteinsäuredehydrogenase-Reaktion ausgenommen, keine Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen Muskelfasern. Diese Tatsache läßt sich auf zweierlei Weise erklären. Erstens kann angenommen werden, daß die morphologische Differenzierung bei den Knochenfischen vor der physiologischen eingetreten ist, was wir indessen nicht für wahrscheinlich halten. Viel plausibler erscheint die Annahme, daß die morphologische Differenzierung auch hier zugleich mit der physiologischen bzw. biochemischen eintritt, aber die gegenwärtig zur Verfügung stehenden histochemischen Untersuchungsmethoden nicht fein genug sind, um sie nachzuweisen, oder ein anderer Unterschied vorliegt, der mit anderen Verfahren aufgezeigt werden kann. Im differenzierten Reizleitungssystem der Säuger sind bereits Veränderungen anwesend, die auch mit den angewandten histochemischen Methoden dargestellt werden können.

## LITERATUR

1. CARBONELL, M. L. (1956) Esterase of the conductive system of the heart. *Histochem. Cytochem.*, **4**, 87—95.
2. GYÉVAI, A. T. (1957) Herzstudien. I. Histologie und Histochemie des Herzens von erwachsenen *Triturus cristatus*. *Acta Biol. Hung.*, **8**, 333—341.
3. SCHIEBLER, T. H. (1953) Histochemische Untersuchungen der Purkinjefasern von Säugern. *Z. Zellforsch.*, **39**, 152—167.
4. SCHIEBLER, T. H. (1955) Histochemische, histologische und experimentelle Untersuchungen am Atrioventricularsystem von Huf- und Nagetiere. *Z. Zellforsch.*, **43**, 243—306.
5. WUNDER, W. (1933) Physiologie der Süßwasserfische Mitteleuropas. **1**, 215—216.

## STUDIES ON HEART

III. Histological and histochemical studies on the heart  
of *Abramis brama*

Bundles of muscle different histologically from the working muscle of the heart can be found to extend from the venous sinus through the centre of the auricle to the atrioventricular boundary in the heart of *Abramis brama*. Similar fibres can be found in the atrioventricular funnel as well. These muscle fibres constitute the conducting and impulse forming parts of the heart in this species. The histochemical tests made indicate that the conduction system does not differ from the working heart muscle. It is only the succinic acid dehydrogenase reaction that shows a difference between the two kinds of muscle fibre. The working heart muscle gives a stronger reaction than do the conducting fibres. This difference is identical with that demonstrated in mammals.

## ОЧЕРКИ О СЕРДЦЕ

III. Гистологические и гистохимические исследования  
на сердце *Abramis brama*

В сердце лещей (*Abramis brama*) из венозного синуса протягиваются через середину предсердия до атриовентрикулярной границы пучки мышц, гистологически отличающиеся от рабочей мышцы сердца. Такие же волокна наблюдаются также в атриовентрикулярной воронке. Эти мышечные волокна образуют в сердце лещей системы для проведения и выработки импульсов. На основании проведенных авторами гистохимических реакций проводящая система не отличается от рабочей мышцы сердца. Исключительно только реакция дегидразы янтарной кислоты показывает отклонения между двумя видами мышечных волокон. Рабочая мышца сердца реагирует сильнее чем проводящие волокна. Данное отклонение идентичное с результатом, полученным в случае исследования млекопитающих.

ANGELA T. GYÉVAI, Budapest IX., Tűzoltó u. 58., Ungarn.

# ROLE OF THE ALTERATIONS IN PHOSPHOROUS METABOLISM IN RESISTANCE TO DICHLOROPHENOXYACETIC ACID

B. FALUDI and ÁGNES FALUDI-DÁNIEL

INSTITUTE OF PHYLOGENETICS AND GENETICS, EÖTVÖS LORÁND UNIVERSITY, BUDAPEST  
(HEAD: B. FALUDI)

(Received December 10, 1959)

## Summary

The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on the phosphorus metabolism in plants was studied on pieces of potato tissue explanted to a medium containing radioactive P. The object of the experiments was to examine the role of P metabolism in the protoplasmic resistance to 2,4-D.

Observations made at 6, 12 and 24 hours gave the following experimental results:

2,4-D inhibits the direct incorporation of P into the potato tissues; applied in toxic concentrations, it even causes cells to loose a part of their endogenous phosphorus compounds. The equilibrium of synthetic and hydrolytic reactions governing the normal level of organic and inorganic P compounds is upset by 2,4-D resulting in the predominant breakdown of organic phosphates.

The phosphorus content of organic P fractions, as referred to the unit of tissue weight, diminishes under the action of 2,4-D, especially in the acid-soluble and lipid-soluble fractions.

In general, the rate at which phosphorus is taken up by the different fractions, is modified by the administration of 2,4-D: accumulation of phosphorus is especially pronounced in the lipid fraction.

The major part of the phosphorus accumulating in the lipid fraction originates from the inorganic P compounds of the soil: the application of 2,4-D channels its incorporation into the phospholipids at a rate which is superior to that of phospholipid breakdown.

The main effect of 2,4-D is presumably due to the physiological or pathological degeneration of the protoplasmic cell membranes, to that of the plasmalemma in particular.

However intricate the mechanism through which 2,4-D affects P metabolism appears to be, it is evident that the toxicity of and resistance to 2,4-D are governed by P metabolism, and depend especially on the metabolism of phospholipids which influences the permeability.

## Introduction

Resistance to growth-regulating selective herbicides varies not only from species to species but from variety to variety as well. Part of the differences in resistance depends on those factors which modify the concentration of the herbicide immediately affecting the cells. The effect of growth regulators depends, among others, on the manner of their penetration [23] and the properties of the surface through which they are absorbed [5]. The intensity of resistance is greatly influenced by the rate at which herbicides are translocated in the plant. This rate is, in its turn, greatly influenced by the intensity of illumination, presumably via the carbohydrates which affect the transport of herbicides [1]. One of the most important growth regulators, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), has been found to become immobilized by high temperatures [4].

Since the factors influencing penetration and translocation cannot be well determined and measured in practice, plasmatic resistance seems to be the only reliable criterion for the determination of toxicity. Above all, the magnitude of plasmatic resistance and sensitivity displayed by plants are genetically determined. The dependence of resistance on species specific properties is strikingly illustrated by the fact that, to achieve a 100-per cent weed control, the concentration of the herbicide has to be twice as high as that needed for eradicating 90 per cent of the plants. So far, we possess but very few data regarding the physiological foundation of genetically determined differences. There are, nevertheless, a few modifying factors that have already been elucidated, *e. g.* the stage of growth [21], nutritional conditions [27], and light [7]. Changes brought about in the structure of the protoplasm have also been studied. Herbicides seem to damage the chloroplasts quite markedly which may explain why 2,4-D affects assimilation unfavourably [18]. The observation that non-toxic concentrations of 2,4-D provoke increased protein accumulation in bean plants [25] and in the potato plant [22] point to changes in the microsomes. Increased amounts of amino acids were observed after treatment with growth-promoting doses of 2,4-D [16], while the contrary was found under the effect of toxic doses [8]. Changes in the cell membranes were observed by VELDSTRA [26] who found in the course of his experiments with red beet that toxic concentrations of 2,4-D caused the cell sap to diffuse from the vacuoles into the medium. The effect of 2,4-D on the intensity of respiration forms the subject of numerous reports [14]. RAKITIN, for example, found that respiration in the tomato fruit seemed to be increasingly governed by flavoproteids, while LEOPOLD [15] observed a decrease in the SH groups of coenzyme-A. FALUDI's experiments with potato-tissue cultures [6] support the view that the action of 2,4-D depends on the presence of free SH groups, an assumption further confirmed by his observation that a synergism seems to exist between the effects of 2,4-D and glutathione. It was demonstrated by HUMPHREYS [11, 12] that, upon a treatment with 2,4-D, glucose is metabolized chiefly through the pentose phosphates pathway in pea plants and maize seedlings. Worthy of note is the fact that a treatment with auxin does not induce a similar phenomenon.

Seeing that certain herbicides affect the permeability of the cell membranes and influence the respiratory system, considering further that phosphorus plays a significant part in these processes, we felt induced to continue our researches with the study of P metabolism [9].

Regarding the effect of 2,4-D upon P metabolism we have, so far, encountered in the literature merely such data as were based on the results of spraying experiments. Having sprayed plants with 2,4-D, NEELY [19] and FANG [10] observed an increase in the total amount of inorganic phosphorus. YAKUSHKINA [13] claims that 2,4-D sprays induce the accumulation of glucose-6-phosphate in the tomato fruit. Toxic doses of 2,4-D were found by BEREZOVSKY [3]

to reduce the amount of total P in sunflowers, and especially that of the macroerg P compounds. RAKITIN [24], treating growing young tomato plants with 2,4-D, observed changes in the amount of  $P^{32}$  of the fruit: he found a slight increase under the effect of promoting doses and a considerable decrease under that of inhibitory concentrations; such decrease was especially pronounced in the acid-soluble, protein and lipid fractions.

Considering that all these experiments were performed on whole plants which took up the herbicide through the cuticle into the tissues of translocation, their results allow only indirect inferences concerning plasmatic processes set off by the toxic action of 2,4-D.

#### Material and Method

Sterile cultures of potato (variety "Gül Baba") were used in the present experiments; the method, elaborated by us, was that described in a previous communication [7]. Since it was the metabolism preceding tumorous cell proliferation, and the early manifestations of intoxication that we wanted to observe, we kept the explants in the cultures for short periods only (6, 12 and 24 hours). The mediums to which the tissue pieces were transferred were of four kinds: controls were kept in a medium that contained no 2,4-D; test pieces were grown in mediums which contained either a suboptimal ( $10^{-7} M$ ), optimal ( $10^{-5} M$ ) or a toxic ( $10^{-3} M$ ) concentration of 2,4-D. Recrystallized herbicide with a controlled melting point was used in order to eliminate the side effect of 2,4-dichlorophenol arising from the disintegration of 2,4-D. Each culture flask contained 4 ml of culture fluid into which 5 pieces of plant tissue, each weighing about 25 mg, were placed; the medium contained  $20 \mu C$  of  $K_2HPO_4$  with a specific activity of  $0,5 mC/mg P$ . Sample groups in each culture series consisted of 20 to 25 tissue pieces taken from 5–5 flasks. A procedure, based on the method of OCUR and ROSEN [20], was employed for the separation of the P fractions of the tissues. Our technique differed from the original in that we prepared the total nucleic-acid fraction by extraction during 20 minutes at  $70^\circ C$  with perchloric acid. We also performed measurements to ascertain the total isotope and total P contents of the samples. Geiger–Müller tubes served for the determination of the radioactive P contents, and the technique of BERENBLUM and CHAIN [2] for that of the total phosphorus. The figures contained in the following tables represent the mean values of 4 to 6 measurements in respect of each concentration. The results of the determinations in the different series showed a variance of about 25 per cent.

#### Results and discussion

The results of computations concerning the amount of phosphorus uptake based on the determination of total P and radioactive P are assembled in Table 1.

It is evident from Table 1 that 2,4-D produces an inhibitory effect on the phosphorus uptake of the tissues.

A comparison of the 6-hour with the 12-hour figures shows the total phosphorus content of tissues grown on mediums with highly concentrated 2,4-D to have a decreasing tendency. Having been convinced by earlier experiments [6] that the water content of tissues grown on mediums with different concentrations of 2,4-D shows no significant variations, the decrease in the amount of total P, as observed in the present experiments, leads to the assumption that the decreasing tendency must be due to the diffusion into the medium of part of the phosphorus compounds. The fact that phosphorus seems to be lost also in mediums which contain the herbicide in a concentration of  $10^{-5} M$ , *i. e.* one

Table 1  
*Effect of 2,4-D in the medium on the P contents of potato tissue*

Duration of treatment hours	Control: no 2,4-D in the medium		$10^{-7} M$ of 2,4-D		$10^{-5} M$ of 2,4-D		$10^{-3} M$ of 2,4-D	
	$P\gamma/g$		$P\gamma/g$		$P\gamma/g$		$P\gamma/g$	
	taken up	total	taken up	total	taken up	total	taken up	total
6 .....	12.45	574	10.08	591	11.05	605	5.28	379
12 .....	23.80	576	24.52	627	25.07	582	11.20	317
24 .....	57.30	644	52.14	622	40.25	567	11.80	281

promoting cell proliferation, might be interpreted to mean that, *qualitatively, both the growth-promoting and the toxic doses of 2,4-D have the same physiological basis.*

We thought that the quantitative values showing the incorporation of inorganic phosphorus into organic compounds would yield more characteristic data than the figures concerning changes in total P. We compared, therefore, the alcohol-soluble fraction (which practically contains inorganic phosphorus only) with the other P fractions.

The figures in Table 2 show an increase of the ratio between inorganic and organic phosphorus in media containing 2,4-D in concentrations of  $10^{-7}$  and  $10^{-5} M$ . This proportion is lower if the concentration of the herbicide becomes toxic ( $10^{-3} M$ ), a phenomenon presumably due in the first line to the loss of inorganic P compounds. If the herbicide is sprayed upon the leaves, the inorganic phosphorus accumulating under its influence cannot so easily move out of the plant as is the case in tissue cultures, and this may be the reason why, according to the literature (e. g. [24]), the increase in the ratio between inorganic and organic phosphorus is strictly in step with the height of herbicide concentration.

As regards now the specific activity of the inorganic P fraction, it appears that, notwithstanding the loss of phosphorus, it is intensive in tissues kept in toxic medium. We must, therefore, conclude that the phosphorus which diffuses into the culture medium does not originate from the P compounds absorbed from the media but is derived from the organic P compounds of the tissue itself.

The ratio between inorganic  $P^{32}$  and organic  $P^{32}$ , indicative of the equilibrium between synthetic and hydrolytic processes, exceeds that of the control after a treatment of 6 and 12 hours. A radical change occurs after a treatment of 24 hours: while the value of the quotient inorganic  $P^{32}$ /organic  $P^{32}$  is considerably reduced in tissues kept in non-toxic media, those in media containing a toxic ( $10^{-3} M$ ) concentration of 2,4-D retain the 12-hour level. We observed in earlier experiments [7] the appearance of a velvety coating of proliferating cells on tissues that had been grown in non-toxic media for 48 hours. The retarded

Table 2

*Effect of 2,4-D, contained in the culture media, on the ratio between inorganic and organic phosphorus in pieces of potato tissue*

Duration of treatment P	No 2,4-D in the media			$10^{-7} M$ of 2,4-D			$10^{-5} M$ of 2,4-D			$10^{-3} M$ of 2,4-D		
	$P^*/\gamma/g$	$P\gamma/g$	$P^*/P$	$P^*/\gamma/g$	$P\gamma/g$	$P^*/g$	$P^*/\gamma/g$	$P\gamma/g$	$P^*/P$	$P^*/\gamma/g$	$P\gamma/g$	$P^*/P$
6 hr. inorganic (I) organic (O) I/O	1.57	150	1.05	2.08	220	0.95	2.02	231	0.88	0.58	72	0.81
	10.37	420	3.26	8.88	383	2.31	8.54	364	2.32	3.90	270	1.44
	0.15	0.36	32	0.23	0.58	41	0.24	0.63	38	0.15	0.27	56
12 hr. inorganic organic I/O	2.94	157	1.87	4.17	230	1.81	4.08	218	1.87	1.36	69	1.75
	19.60	425	4.62	17.45	365	4.78	15.98	349	4.57	6.31	255	2.44
	0.15	0.37	41	0.24	0.63	38	0.26	0.63	41	0.21	0.27	72
24 hr. inorganic organic I/O	5.52	172	3.21	5.82	242	2.41	4.90	230	2.12	1.92	60	3.30
	49.07	458	10.71	49.03	390	12.58	38.58	316	12.19	8.02	211	9.80
	0.11	0.38	30	0.11	0.62	19	0.13	0.73	17	0.24	0.28	82

*growth of tissues kept in the control medium (no 2,4-D) or in media with a sub-optimal concentration of 2,4-D does not manifest itself until the 5th and 10th day respectively.*

These phenomena justify the conclusion that cell division or the process preceding mitosis begins during the first 24 hours on the surface of tissues explanted to a non-toxic medium; since new tumorous cells have a high synthesizing power, the process in question must necessarily lead to a comparative diminution of the amount of inorganic phosphorus derived from freshly taken-up phosphorus. *No cell division occurs in tissues transferred to mediums containing a toxic concentration of 2,4-D, so that the value of the quotient inorganic P<sup>32</sup>/organic P<sup>32</sup> remains high in spite of the diffusion of phosphorus into the medium.*

The fact that the respective curves of the ratios total inorganic P/total organic P and inorganic P<sup>32</sup>/organic P<sup>32</sup> show different courses admits the inference that 2,4-D affects different fractions in a different manner.

Figures indicative of the effect produced by 2,4-D on the P content of the various fractions are assembled in Table 3.

**Table 3**  
*Effect of 2,4-D in the culture medium on the P fractions of potato tissue*

Duration of treatment hours	Fraction	No 2,4-D		10 <sup>-7</sup> M of 2,4-D		10 <sup>-5</sup> M of 2,4-D		10 <sup>-3</sup> M of 2,4-D	
		P <sub>γ</sub> /g	%	P <sub>γ</sub> /g	%	P <sub>γ</sub> /g	%	P <sub>γ</sub> /g	%
6	IF	150	26.4	220	36.6	231	38.8	72	21.1
	ASF	250	43.7	210	34.9	180	30.3	126	36.3
	LSF	27	4.7	26	4.3	25	4.2	18	5.3
	NAF	85	14.9	82	13.6	83	13.9	75	22.0
	PF	58	10.3	66	10.6	76	12.8	51	14.8
	Total	570	100.0	604	100.0	595	100.0	342	100.0
12	IF	157	27.0	230	37.4	218	38.4	69	21.3
	ASF	254	43.7	205	33.4	163	28.7	121	37.3
	LSF	26	4.5	26	4.2	27	4.7	16	4.9
	NAF	85	14.6	82	13.3	81	14.3	64	19.7
	PF	60	10.2	72	11.7	78	13.9	54	16.8
	Total	582	100.0	615	100.0	567	100.0	324	100.0
24	IF	172	27.2	242	38.2	230	42.0	60	22.2
	ASF	282	44.8	210	33.3	124	22.5	108	40.0
	LSF	31	4.9	28	4.4	28	5.1	12	4.5
	NAF	85	13.5	82	13.0	83	15.3	53	19.3
	PF	60	9.6	70	11.1	81	15.1	38	14.0
	Total	638	100.0	632	100.0	546	100.0	271	100.0

IF = Inorganic (alcohol-soluble) fraction

ASF = Acid-soluble fraction

LSF = Lipid-soluble fraction

NAF = Nucleic-acid fraction

PF = Protein (alkali-soluble) fraction.

A comparison of the percentual distribution of the total P content of the different fractions reveals that there occurred no significant change during the treatment of 6–24 hours in the tissues kept in the medium that contained no 2,4-D, whereas — as has already been noted — the P content of the alcohol-soluble fraction increased in the medium with 2,4-D at a concentration of  $10^{-7}M$ ; this increase occurred simultaneously with a significant *decrease in the content of the acid-soluble fraction*. This phenomenon seems to show that the metabolism of carbohydrates and that of ATP are most sensitive to 2,4-D. As regards now the concentration of  $10^{-5}M$ , the effect of 2,4-D on the said two fractions was as described above, while the alkali-soluble fraction containing *protein-phosphorus* was found to increase. The effect of 2,4-D in a toxic concentration of  $10^{-3} M$  was this: notwithstanding the diminution of absolute P contents, the amount of phosphorus remained high in the organic compounds, a fact attributable to their more difficult mobilization which delays their diffusion out of the tissues.

Figures showing the effect of 2,4-D on the amount of phosphorus incorporated into the P fractions of the potato tissue, as inferred from their radioactivity, are assembled in Table 4.

Table 4

*Effect of 2,4-D in the culture medium on the incorporated P into fractions of potato tissue*

Duration of treatment hours	Fraction	No 2,4-D		$10^{-7}M$ of 2,4-D		$10^{-5}M$ of 2,4-D		$10^{-3}M$ of 2,4-D	
		P $\gamma/d$	%	P $\gamma/g$	%	P $\gamma/g$	%	P $\gamma/g$	%
6	IF	1.57	14.2	2.08	19.0	2.02	19.0	0.58	12.9
	ASF	9.56	79.7	8.14	74.5	7.83	73.5	3.36	74.8
	LSF	0.34	2.8	0.37	3.4	0.41	3.9	0.45	10.1
	NAF	0.36	3.0	0.29	2.6	0.22	2.9	0.08	1.8
	PF	0.11	0.3	0.08	0.5	0.10	0.7	0.01	0.4
Total		11.94	100.0	10.96	100.0	10.58	100.0	4.48	100.0
12	IF	2.94	13.1	4.17	19.2	4.08	20.0	1.36	17.7
	ASF	16.95	75.2	14.70	68.0	13.53	67.6	4.57	59.6
	LSF	0.74	3.1	0.81	3.8	0.98	4.9	1.47	19.22
	NAF	1.72	7.7	1.72	7.9	1.25	6.2	0.25	3.3
	PF	0.19	0.9	0.22	1.1	0.22	1.3	0.02	0.3
Total		22.54	100.0	21.62	100.0	20.26	100.0	7.67	100.0
24	IF	5.52	10.0	5.82	10.6	4.90	11.5	1.92	19.0
	ASF	43.45	79.3	41.20	75.5	28.22	66.3	5.08	51.6
	LSF	1.51	2.8	1.72	3.1	2.98	7.1	2.24	22.4
	NAF	3.78	6.9	5.64	10.0	5.63	13.3	0.61	6.1
	PF	0.33	1.0	0.47	0.8	0.64	1.8	0.09	0.9
Total		54.59	100.0	54.85	100.0	42.37	100.0	9.94	100.0

Notation of fractions as in Table 3.

It is evident from Table 4 that the changes in the amount of that phosphorus which is taken up from the medium by the different fractions *is not in agreement with changes regarding the total P content of the fractions*. Incorporation of phosphorus is most vigorous in the acid-soluble fraction, and a significant inhibition appears only after a toxic treatment of 24 hours. Both the absolute and relative amount of phosphorus taken up by the *lipid-soluble fraction* show a *rapid increase* with rising concentrations of 2,4-D. As regards the nucleic-acid fraction, a subtoxic concentration of 2,4-D *promotes*, one of  $10^{-3} M$  *inhibits*, the incorporation of phosphorus.

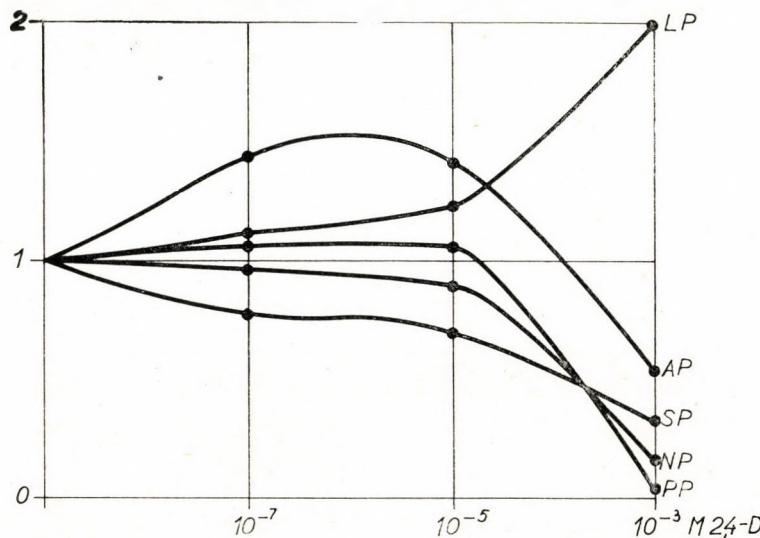


Fig. 1. Effect of various concentrations of 2,4-D on the rate at which phosphorus is taken up by pieces of potato tissue. Notation of fractions as in the tables

There are significant differences between the individual fractions in respect of the rate at which phosphorus is taken up, *a rate which is indicative of the balance between uptake and loss of phosphorus*. The rates of phosphorus uptake are illustrated in Fig. 1 with reference to that of tissue pieces kept in the control medium which contains no 2,4-D.

It follows from Fig. 1 that, regarded from the viewpoint of the effect which 2,4-D in the medium produces on the rate of P uptake, the phosphorus fractions in the potato tissue *are of four types*:

1. Non-toxic concentrations of 2,4-D promote, toxic concentrations inhibit the uptake of phosphorus in the *alcohol-soluble* and *alkali-soluble* fractions.
2. The rate of uptake is slowed down in the *acid-soluble* fraction by treatment with 2,4-D.

3. A toxic concentration of 2,4-D inhibits phosphorus uptake and none of the lower concentrations produces effect in the *nucleic-acid* fraction.

4. Quite different is the curve which shows the rate of P uptake by the *lipid-soluble* fraction. This rate *increases in step with rising concentrations of 2,4-D*. This observation is particularly worthy of note if we remember that it is this fraction which contains the *chief component of the cell membranes* and that these membranes are presumably the principal factors involved in the changes of permeability induced by the herbicide.

One of the questions arising in this connection — one that has not been cleared up in the foregoing — is whether phosphorus accumulating *in the lipid fraction derives from the culture medium or from one of the P compounds contained in the cells*. No answer to this question is offered in the available literature. When investigating the primary compounds formed by means of phosphorus uptake, LOUGHMAN [17] concerned himself with the acid-soluble fraction only.

With a view to solving this problem, we started a separate group of experiments. The method we used consisted in keeping the pieces of tissue in a medium with radioactive phosphorus for 6 hours and transferring them thereafter to a *medium containing normal phosphorus*. What we expected was that the specific activity of the fractions which were in immediate contact with the phosphorus of the medium would show a more pronounced decrease than that of fractions which obtained phosphorus from the other fractions and not immediately from the nutrient medium. Figures indicating the special activity of P fractions in tissues transferred from radioactive to normal medium are shown in Table 5.

It can be seen from Table 5 that it is the *lipid fraction* which shows the most *rapid* reduction of specific activity in the mediums containing a concentration of  $10^{-5}M$  and  $10^{-3}M$  of 2,4-D, respectively. This suggests the conclusion that *the surplus amount of phosphorus in this fraction derives chiefly from the medium*. If the increase in the amount of phosphorus were due to a transfer from other — already activated — fractions, the diminution of the specific activity *could not be so pronounced*. Again, the fact that the surplus amount of phosphorus in the lipid fraction derives from the medium seems to show that the mechanism through which 2,4-D inhibits phosphorus uptake consists, in the main, in a *structural change of the plasmalemma*.

*That a rapid diminution of the specific activity of the lipid fraction also occurs in a medium containing the growth regulator in a concentration of  $10^{-5}M$*  leads to the supposition that a denaturation of cell membranes is needed for uncontrolled growth, while their physiological degeneration may be necessary even for *normal cell division*.

We do not think that it is a simple *physical action* by which 2,4-D degenerates the cell membranes as, otherwise, phosphorus ought to diminish as rapidly in all fractions as it does in the lipid fraction.

Table 5

*Effect of different concentrations of 2,4-D, contained in the nutrient medium, on the specific activity of P fractions in pieces of potato tissue*

Hours of treatment	Fraction	No 2,4-D in media		$10^{-7}M$ of 2,4-D		$10^{-5}M$ of 2,4-D		$10^{-3}M$ of 2,4-D	
		P*/P%	Referred to 6 hours	P*/P%	Referred to 6 hours	P*/P%	Referred to 6 hours	P*/P%	Referred to 6 hours
6	IF	1.05	1.00	0.95	1.00	0.88	1.00	0.81	1.0
	ASF	3.83	1.00	3.88	1.00	4.25	1.00	2.67	1.0
	LSF	1.26	1.00	1.42	1.00	1.62	1.00	2.50	1.0
	NAF	0.42	1.00	0.35	1.00	0.28	1.00	0.11	1.0
	PF	0.19	1.00	0.12	1.00	0.08	1.00	0.02	1.0
12	IF	1.29	1.23	0.91	0.95	0.82	0.92	0.58	0.71
	ASF	3.28	0.86	3.74	0.96	4.17	0.98	1.44	0.54
	LSF	2.32	1.85	1.39	0.98	0.81	0.50	0.75	0.30
	NAF	0.78	1.85	0.50	1.43	0.41	1.41	0.07	0.64
	PF	0.30	1.57	0.19	1.59	0.18	2.26	0.04	2.00
24	IF	1.27	1.20	0.71	0.74	0.59	0.65	0.45	0.56
	ASF	2.58	0.67	3.40	1.14	3.55	1.30	0.83	0.29
	LSF	1.16	0.92	0.68	0.48	0.75	0.46	0.08	0.03
	NAF	0.78	1.87	0.58	1.66	0.44	1.52	0.06	0.54
	PF	0.30	1.58	0.20	1.67	0.17	2.14	—	—

For notation of fractions see Table 3.

More acceptable seems the assumption that *the degeneration of the plasmalemma* is due to changes occurring in intracellular P metabolism.

Table 6 illustrates the *intracellular path of phosphorus* as affected by 2,4-D.

It can be seen from the figures of Table 6 that *the amount of radioactive substances increases* in the alcohol and lipid-soluble fractions if the medium contains no 2,4-D. There are two alternatives to explain this phenomenon. The first is the assumption that the increase is due to hydrolytic processes. The second is the possibility that there remains some residual isotopic phosphorus (of the media) on the surface of the tissue pieces or in the intercellular spaces. The figures showing the total amount of  $P^{32}$  reveal an approximately 5 per cent increase 6 hours after the transplantation of the tissues to the medium which contains normal phosphorus; this surplus amount is near the limit of error and shows no further increase during the following 12 hours. *Seeing that the increase of the  $P^{32}$  content in the alcohol and lipid-soluble fractions appears only in the 12-hour samples*, we are inclined to accept the latter explanation, especially as the increase in the amount of  $P^{32}$  would surely be more in step with the duration of treatment if it were due to hydrolysis. This methodical source of error is of the same order in all tissues regardless of the concentration of the growth regulator,

Table 6

*Effect of different concentrations of 2,4-D, contained in the medium, on the intracellular fate of phosphorus absorbed by pieces of potato tissue*

Duration of treatment	No 2,4-D in medium		$10^{-7}M$ of 2,4-D		$10^{-5}M$ of 2,4-D		$10^{-3}M$ of 2,4-D	
	P <sup>32</sup> γ/g	Referred to 6 hr.	P <sup>32</sup> γ/g	Referred to 6 hr.	P <sup>32</sup> γ/g	Referred to 6 hr.	P <sup>32</sup> γ/g	Referred to 6 hr.
Total uptake in 6 hr. (Table 4) .....	11.94	1.00	10.96	1.00	10.58	1.00	4.48	1.00
After 12 hr.								
IF .....	2.04	1.30	2.08	1.00	1.78	0.88	0.40	0.69
ASF .....	8.32	0.87	7.65	0.94	6.82	0.82	1.74	0.52
LSF .....	0.58	1.70	0.36	0.99	0.22	0.54	0.12	0.27
NAF .....	0.66	1.84	0.41	1.42	0.35	1.59	0.04	0.50
PF .....	0.18	1.64	0.14	1.60	0.14	1.40	0.02	0.20
Total .....	11.78	0.99	10.64	0.97	9.31	0.88	2.32	0.52
Loss .....	0.16	0.01	0.32	0.03	1.27	0.12	2.16	0.43
After 24 hr.								
IF .....	2.18	1.39	1.72	0.83	1.37	0.67	0.27	0.39
ASF .....	7.30	0.71	7.17	0.88	6.85	0.87	0.90	0.23
LSF .....	0.36	1.05	0.19	0.51	0.21	0.54	0.10	0.27
NAF .....	0.66	1.83	0.48	1.65	0.36	1.63	0.03	0.22
PF .....	0.18	1.60	0.14	1.60	0.14	1.40	0.01	0.09
Total .....	10.68	0.98	9.70	0.89	8.93	0.84	1.31	0.29
Loss .....	0.26	0.02	1.36	0.11	1.65	0.16	3.17	0.71

so that the relative values of our data offer a reliable basis for the assessment of the effect produced by 2,4-D.

The amount of isotope in the alcohol-soluble fraction goes rapidly down in media containing 2,4-D, a phenomenon indicative of the fact that the amount of phosphorus lost by the fraction is considerably in excess of that taken up from the intercellular spaces. The uptake of labelled phosphorus by the acid-soluble fraction is slightly increased by growth-promoting doses of 2,4-D, while toxic doses are followed by a loss of P<sup>32</sup> also in this fraction. The lipid fraction behaves in this respect quite like the alcohol-soluble fraction. Notwithstanding the rapid rate at which phosphorus is incorporated into the lipid fraction, the amount of P<sup>32</sup> shows a decreasing tendency with the rise of the herbicide level which justifies the conclusion that the increase of the amount of phosphorus in this fraction must be due to such a stimulation of biosynthesis of lipid-phosphorus which is much higher than the rate of its breakdown. It is interesting to note that, during the first 12 hours, the P content of the nucleic-acid and alkali-soluble fractions increases very considerably in media with normal phosphorus which contain no 2,4-D or contain it in concentrations of  $10^{-7}$  and  $10^{-5} M$ , while it remains constant during the next 12 hours of treatment. This seems to prove that, in

contrast to the lipid fraction, an *equilibrium* between the uptake and loss of labelled phosphorus is reached in these fractions during the first 12 hours, *i. e.* before the sample is taken. The application of a toxic dose of 2,4-D is followed by a rapid decrease of the radioactive substance in the nucleic-acid and the alkali-soluble fractions alike.

All these observations lead to the conclusion that sensitivity to 2,4-D is closely correlated with phosphorus, and especially with *phospholipid* metabolism. Phospholipids are known to play an important part in the construction of mitochondrial structures and cell membranes. Our further investigations are, therefore, concerned with problems of this kind.

#### LITERATURE

1. BARRIER, G. E., LOOMIS, W. E. (1957) Absorption and translocation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and P<sup>32</sup> by leaves. *Plant Physiol.*, **32**, 225—231.
2. BERENBLUM, I., CHAIN, E. (1938) An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *Biochem. J.*, **32**, 295—298.
3. Березовский, М. Я., Куровкина, В. Ф. (1957) Изучение влияния 2,4-дихлорфеноксикусной кислоты на поступление и распределение P<sup>32</sup> в растении. *Докл. Акад. Наук СССР*, **113**, 458—462.
4. ELROY, L. R., ROHRBAUGH, L. M. (1955) Effects of temperature on the immobilization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in bean leaves in darkness. *Bot. Gaz.*, **116**, 261—266.
5. ENNIS, W. B., WILLIAMSON, R. F., DORSCHNER, K. P. (1952) Studies on spray retention by leaves of different plants. *Weeds*, **1**, 274—286.
6. FALUDI, B. (1956) Die Wirkung 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und Glutathion auf das Wachstum der Gewebekulturen von Kartoffeln. *Naturwiss.*, **43**, 280.
7. FALUDI, B. (1957) Data on the physiology of growing potato tissue in vitro. *Ann. Univ. Sci. Budapestiensis*, **1**, 55—60.
8. FALUDI, B., DÁNIEL, Á. F. (1958) The effect of different concentrations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the growth, amino acid and  $\alpha$ -keto acid content of potato tissue cultures. *Acta Biol. Hung.*, **8**, 274—282.
9. FALUDI, B., DÁNIEL, Á. F., KOVÁCS, E., BÁLINT, A. (1959) Adatok a 2,4-diklófenoxieacet-sav növényi foszfor anyagcsereére gyakorolt hatásával kapcsolatban. Data regarding the effect of 2,4-D on the phosphorus metabolism in plants. *Biol. Közlemények*, **7**, 7—20. (In Hungarian, with English summary.)
10. FANG, S. C., BUTTS, J. S. (1954) Studies on plant metabolism IV. Comparative effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and other plant growth regulators on phosphorus metabolism in bean plants. *Plant Physiol.*, **29**, 365—368.
11. HUMPHREYS, T. E., DUGGER, W. M. JR. (1957) The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on pathways of glucose-metabolism in higher plants. *Plant Physiol.*, **32**, 136—140.
12. HUMPHREYS, T. E., DUGGER, W. M. JR. (1957) The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the respiration of etiolated pea seedlings. *Plant Physiol.*, **32**, 530—536.
13. Якушина, Н. И. (1956) Влияние стимуляторов роста на фосфорный обмен у томатов. *Докл. Акад. Наук СССР*, **109**, 635—637.
14. KELLY, S., AVERY, G. S. JR. (1949) The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and other physiologically active substances on respiration. *Amer. J. Bot.*, **36**, 421—426.
15. LEOPOLD, A. C., GUERNSEY, F. S. (1953) The theory of auxin action involving coenzyme A. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **39**, 1105—1109.
16. LIVINGSTON, C., PAYNE, M. G., FULTS, J. L. (1954) Effects of maleic hydrazide and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on free amino acids in sugar beet. *Bot. Gaz.*, **116**, 148—156.
17. LOUGHMAN, B. C., ROSSEL, R. S. (1957) The absorption and utilization of phosphate by young barley plants. IV. The initial stages of phosphate metabolism in roots. *J. Exp. Bot.*, **8**, 280—294.
18. LOUSTALOT, A. J., MORRIS, P. M., GARCIA, J., PAGAN, C. (1953) 2,4-D affects phosphorous metabolism. *Science*, **118**, 627—628.
19. NEELY, W. B., BALL, C. D., HAMMER, C. L., SELL, H. M. (1950) Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the invertase, phosphorylase and pectinmethoxylase activities in the stems and leaves of red kidney bean plants. *Plant Physiol.*, **25**, 525—528.

20. OGUR, M., ROSEN, G. (1950) The nucleic acids of plant tissues. I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid. *Arch. Biochem.*, **25**, 262—276.
21. OLSON, P. J., ZALIK, S., BREAKY, N. J., BROWN, D. A. (1951) Sensitivity of wheat and barley at different stages of growth to treatment with 2,4-D. *Agron. J.*, **43**, 77—83.
22. PAYNE, M. G., FULTS, J. L., HAY, R. I. (1952) The effect of 2,4-D treatment of free amino acids in potato tubers. *Amer. Potato J.*, **29**, 142—150.
23. Ракитин, Ю. В. (1947) Применение ростовых веществ в растениеводстве. Москва.
24. Ракитин, Ю. В., Поволоцкая, К. (1956) О некоторых изменениях обмена веществ в цветках и плодах при действии 2,4-Д и 2, 4, 5-Т. *Физиол. раст.*, **5**, 297—305.
25. SELL, H. M., LUECKE, R. W., TAYLOR, B. B., HAMMER, C. L. (1949) Changes in the chemical composition of stems of red kidney bean plants treated with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Physiol.* **24**, 295—299.
26. VELDSTRA, H., BOOIJ, H. L. (1949) Researches on plant growth regulators XVII. Structure and activity. On the mechanism of action. III. *Biochim. Biophys. Acta.*, **3**, 278—312.
27. WOLF, D. E., VERMILLION, G., WALLACE, A., AHLGREN, G. H. (1950) Effect of 2,4-D carbohydrate and nutrient content and kill of soybeans. *Bot. Gaz.*, **112**, 188—197.

### DIE ROLLE VON VERÄNDERUNGEN DES PHOSPHORSTOFFWECHSELS IN DER RESISTENZ GEGENÜBER 2,4-DICHLORPHENOXYESSIGSÄURE

An Kartoffelgewebestückchen, die auf Isotopphosphor enthaltenden Nährboden gelegt wurden, erfolgte die Untersuchung der Wirkung von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) auf den Phosphorstoffwechsel von Pflanzen. Das Ziel der Untersuchungen war es festzustellen welche Rolle der Phosphorstoffwechsel in der Resistenz des Protoplasmas gegenüber 2,4-D spielt.

An Hand der nach 6, 12 und 24 stündiger Behandlung erfolgten Untersuchungen wurde festgestellt, daß:

2,4-D den unmittelbaren Einbau des Phosphors in die Kartoffelgewebe verhindert, bei Verwendung einer toxischen Konzentration geben die Zellen sogar einen Teil ihres eigenen Phosphorgehaltes ab; auf Wirkung von 2,4-D wird das Gleichgewicht der Einbau-Abbaureaktionen zwischen den organisch und anorganisch gebundenen Phosphorverbindungen zu Gunsten des gesteigerten Abbaus der anorganischen Phosphate verschoben.

Der Phosphorgehalt in Gewichtseinheiten des Gewebes von organischen Phosphorfraktionen vermindert sich auf Wirkung von 2,4-D hauptsächlich in säurelöslichen und lipoidlöslichen Fraktionen.

Die Schnelligkeit des Phosphoreinbaus in die einzelnen Fraktionen wird durch 2,4-D in der Regel modifiziert, und innerhalb dieser Fraktionen kann eine besonders große Phosphoranhäufung in den Lipoidfraktionen wahrgenommen werden.

Der überwiegende Teil des in den Lipoidfraktionen sich anhäufenden Phosphors stammt aus dem anorganischen Phosphorgehalt des Nährbodens, 2,4-D stimuliert den Einbau in die Phospholipoide in größerem Maße, als den Abbau der letzteren.

Die Wirkung von 2,4-D kann auf die physiologische, bzw. pathologische Denaturierung der Grenzmembranen des Protoplasmas, in erster Reihe der Plasmolemma zurückgeführt werden.

Bei aller Kompliziertheit des im Zusammenhang mit der Wirkung von 2,4-D auf den Phosphorstoffwechsel erhaltenen Bildes ist es klar ersichtlich, daß die Toxizität, bzw. Resistenz von 2,4-D vom Phosphorstoffwechsel, und innerhalb desselben besonders von der Gestaltung des die Permeabilitätsverhältnisse beeinflussenden Lipoid-Phosphorstoffwechsels abhängig ist.

### РОЛЬ ИЗМЕНЕНИЙ ФОСФОРНОГО ОБМЕНА В УСТОЙЧИВОСТИ В ОТНОШЕНИИ К 2,4-ДИХЛОРОФЕНОКСИУКСУСНОЙ КИСЛОТЕ

На кусках картофельной ткани, помещенных на питательную среду, содержащую изотопы фосфора, исследовалось действие 2,4-дихлорофеноксуксусной кислоты (2,4-Д). Целью исследований было установление роли фосфорного обмена в протоплазматической устойчивости в отношении 2,4-Д.

На основании исследований после 6, 12 и 24 часовой обработки было установлено следующее:

2,4-Д препятствует непосредственному включению фосфора в ткани картофеля, при применении токсической концентраций клетки отдают даже часть собственного содержания фосфора; на действие 2,4-Д равновесие реакций ассимиляция-диссимиляция, существующее между фосфорными соединениями органической и неорганической связей смещается в сторону усиленного разложения органических фосфатов;

содержание фосфора в единице веса ткани органических фосфорных фракций уменьшается под действием 2,4-Д, главным образом в фракциях, растворимых в кислоте и в липоидах;

скорость включения фосфора в отдельные фракции, как правило, видоизменяется под действием 2,4-Д, и в пределах этого особенно большое накопление фосфора наблюдается в липоидных фракциях;

преобладающая часть накапливающегося в липоидных фракциях фосфора происходит из содержания неорганического фосфора в питательной среде; 2,4-Д стимулирует включение в фосфолипоиды в большей мере, чем их расщепление;

действие 2,4-Д можно отнести к физиологической или же патологической денатурации пограничной мембранны протоплазмы, прежде всего плазмолеммы;

вопреки сложности картины, полученной в связи с действием 2,4-Д на фосфорный обмен, ясно видно, что токсичность 2,4-Д или же устойчивость зависит от фосфорного обмена, и в пределах этого в частности от влияющего на условия проницаемости фосфорного обмена липоидов.

BÉLA FALUDI, Budapest, VIII. Múzeum krt. 4/a, Hungary.

ÁGNES FALUDI-DÁNIEL, Budapest, VIII. Múzeum krt. 4/a, Hungary.

# THE BIO-ASSAY OF PRIMYCIN

L. NYIRI

BIOLOGICAL RESEARCH LABORATORY OF THE "HAJDUSÁG" PHARMACEUTICAL WORKS, DEBRECEN

(Received January 15, 1960)

## Summary

Bio-assay was elaborated for the quantitative determination of activity of primycin. Using agar basal medium containing relatively small amounts of protein and peptone and a methanol — pH 8,04 phosphate buffer mixture for the dilutions, this antibiotic of low diffusibility and of alcalic character was estimated against *Bacillus subtilis* FDA 6633.

The determination of active compound was made using a special nomograph described for the two-dose assay methods.

A rapid method for the estimation of error was also worked out. The error of the bio-assay was  $\pm 2-7$  per cent.

The method was suitable to follow the changes of the activity of primycin during the course of fermentations and preparative processes.

## Introduction

The difficulties encountered in the determination of the activity of primycin by chemical method [6] warranted studies on a reliable biological test.

Previous investigations made at the Institute of Pharmacology, University of Debrecen [7] led to the conclusion that the conventional agar-diffusion method might serve as a base for reliable biological estimation of this antibiotic.

There was namely a logarithmic relation between the concentration of the effective substance and the resulting inhibition zone.

## Technical part

### Materials and methods for the estimation

The test microorganism for the determination of the activity of primycin was *Bacillus subtilis* FDA 6633. Spores of this strain were used for the inoculation of the basal medium. The mode of cultivation of the test strain and the preparation of standard spore suspension was similar to that described by NYIRI [3].

After testing various basal media we have chosen a medium already used for the estimation of antibiotics of alcaline character [5].

The components of this medium were the following:

0,5% peptone (WITTE)  
1,0%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

dissolved in fresh horse-bouillon.

This basal medium was then diluted ten times with distilled water.

We added then 2% washed agar-agar to the medium and adjusted the pH to 8.3 by 0.1 N NaOH.

Sterilization was carried out by autoclaving the medium at 1.3 atm for 30 minutes. After autoclaving a pH control seemed to be necessary. The required value was pH 8.0.

This medium could be stored at +2° C for one month. Before use we melted it again by autoclaving at 1.0 atm for 15 minutes.

For the estimation glass trays were used with  $23.5 \times 18.0$  cm of side dimensions. In these planparallel plates the thickness of the solidified agar medium (using single layer) had to be exactly 3.0 mm. Cups of 10 mm in diameter were punched out from the agar by sterilized cork-borer.

The different solutions of primycin were in every case diluted in a mixture of distilled methanol and pH 8.04 SÖRENSEN phosphate buffer (ratio 1 : 1). After dilution and filling the cups, the plates were incubated overnight at 37° C.

The diameters of developed inhibition zones of bacterial growth were then measured by slide-gauge with 0.1 mm accuracy.

#### *Dose-response curve*

To establish the dosage-response curve a purified primycin preparation was used.

10.0 mg of the preparation was dissolved in 100.0 ml lukewarm distilled water (stock solution). Then using the methanol buffer mixture the stock solution was diluted preparing thus a series of dilutions in which the concentration of the antibiotic was 4.0, 2.0, 1.0, 0.5 and 0.25 γ/ml respectively. The diameters of the inhibition zones elicited by the different concentrations of the effective standard material are presented in Fig. 1.

From the relationship obtained under standard conditions it was obvious that the slope of the curve is most satisfactory between the values of 2.0 and 0.5 γ/ml.

As the assay technique seemed to be simple and the data of repeated experiments were also satisfactory, for the comparison of the unknown samples to the standard the 4-point, two-dose assay type was applicable.

*The assay of activity of final products*

A solution of 100.0  $\gamma/ml$  concentration of final, powdered, homogenized preparation was prepared. This solution was further diluted 50 and 200 times. Thus the theoretical concentrations of the solutions were 2.0 and 0.5  $\gamma/ml$ , respectively. 0.1 ml of each solutions was then measured into the cups of the agar-plate. Likewise 0.1 ml of the standard solutions served as control.

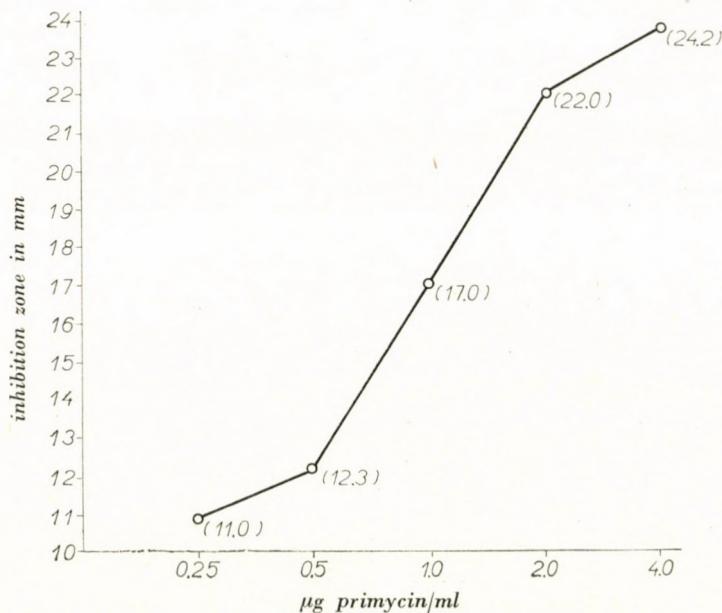


Fig. 1. Relation of the inhibition zones to primycin concentration

After incubation the mean values of the diameters of inhibition zones were calculated. The activity of the unknown sample as per cent of standard ( $\Theta$ ) was then calculated by the use of the following formula [2]:

$$\log \Theta = \frac{V}{W} (\log A)$$

$$V = (S_H + S_L) - (St_H + St_L)$$

$$W = (S_H + St_H) - (S_L + St_L)$$

where  $A$  is the degree of dilution,  $S_H$  and  $S_L$  are the mean values of diameters of inhibition zones caused by the unknown samples' high level (2.0  $\gamma/ml$ ) and lower level (0.5  $\gamma/ml$ ) application, respectively, and the  $St_H$  and  $St_L$  are the corresponding values related to the standard.

Using the nomograph I (Fig. 2) on the basis of  $V$  and  $W$  values we got the percentual activity of the unknown sample as compared to the standard.

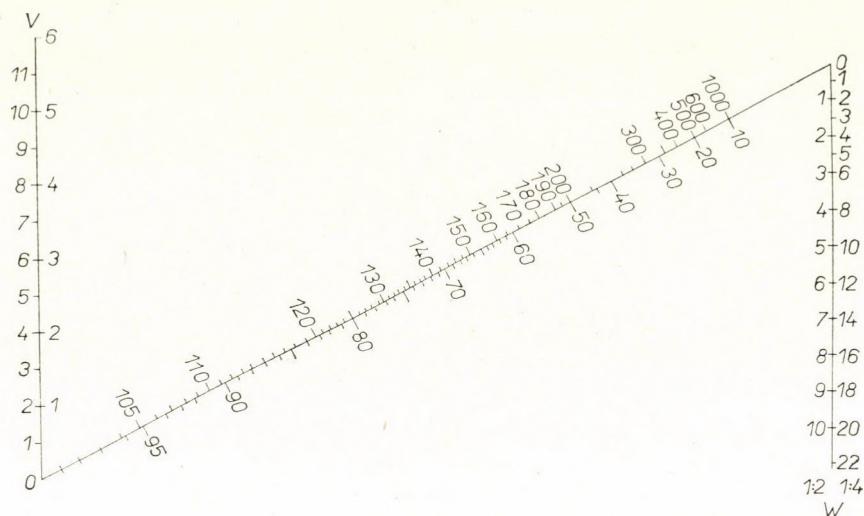


Fig. 2. Nomograph on the basis of  $V$  and  $W$  values

In the case of final products this figure was equal to the sample's weight/ml value.

Table 1

Example 1

*The bio-assay of the No. 34. E. K. finished product*

dilution	50 ×	200 ×
standard values in mm	21,2*	13,0
sample values in mm	20,6	12,6

\* Figures presented in the Table are the average values of the diameters of inhibition zones in mm.

The calculations of the potency of sample No. 34. E. K. work out at 92.5%.

*The assay of activity of primycin in fermentation juices*

Assay was made with unfiltered fermentation juices containing mycelia. These were so diluted in the mixture of methanol-buffer that the primycin concentration of the diluted juice should be, as possible, within the 2.0—0.5  $\gamma/\text{ml}$  range. It was necessary to make a further dilution in the ratio 1 : 4 and then 0.1 ml of these two dilutions of the sample were plotted against the standard solutions.

The manner of calculations was similar to that described in the case of final products. We calculated the weight/ml primycin concentration of the fermentation juice using the obtained  $\Theta$  value in the following formula:

$$C = \frac{\Theta 2 h}{100}$$

where the  $C$  is weight/ml active substance and  $h$  is the degree of dilution.

**Table 2**

Example 2

*The bio-assay of fermentation juice No. K-4. ch. 34.*

The supposed concentration of the primycin in the fermentation juice 50  $\gamma$ /ml.

We made a  $25 \times$  and a  $1 : 4$  ( $100 \times$ ) dilution of the sample.

	standard		sample	
	2.0 $\gamma$ /ml	0.5 $\gamma$ /ml	25 $\times$	100 $\times$
mean values of inhib. zones in mm	23.5	13.9	23.3	14.6

$\Theta = 102\%$

The real concentration of the fermentation juice : 51.0  $\gamma$ /ml.

### *The assay of primycin in body fluids and organs*

The method for the estimation in body fluids was similar to that described in the case of fermentation juices. It was necessary to homogenize the investigated organs in Waring-blendor at  $+2^\circ$  C temperature in presence of a certain amount of methanol.

Further manipulations has been made according to the method of estimation in fermentation juices.

### *The validity of the estimation*

As the chemical assay of primycin activity by SAKAGUCHI-test seemed to be inapplicable in fermentation juices, intermediary products and body fluids, the obtained data were comparable only with repeated bio-assays.

In Table 3 data of repeated estimations of various unknown samples are given. The repetitions were made by the same analyst on successive days under standard conditions.

### *The estimation of error*

It was necessary to estimate the percentual error of individual assays every day.

Thus we wanted to determine the extreme values of the obtained data for each sample on the basis of extreme values of diameters of inhibition zones caused by one dilution.

Table 3

The deviation from the mean data obtained from various samples

Assay No.	Fermentation juice		Intermediary prod.		Highly pure		Pulped lung	
	No. 4222	recov. %	No. Cr./6.	recov. %	prod. 3.	recov. %		recov. %
1.	150*	99.5	25.0**	99.2	99.0**	99.4	4.0*	73.0
2.	150	99.5	-27.0	105.2	100.0	100.0	6.0	109.0
3.	150	99.5	26.2	104.0	98.0	98.4	7.0	127.0
4.	154	102.0	23.4	92.8	100.0	100.4	6.0	109.0
5.	152	100.8	24.8	98.4	101.0	102.0	4.0	73.0
av.	151		25.2		99.6		5.5	
disp.		+2.0		+5.2		+2.0		+27.0
%		-0.5		-7.2		-1.6		-27.0

\*Numbers are given in  $\gamma/ml$ 

\*\* Numbers are given in per cent

Results were obtained using six cups for each dilutions

For the estimation of error of the two dose bio-assay an official method was given by US Food and Drug Administration [4]. Having two nomographs and a number of various mathematical operations this method, however, seemed hardly usable for us. Combining the two nomographs and shortening the operation of raising to the square a more rapid method of estimation of error was worked out.

For the base of operations, knowing the mode of calculation of the per centual activity of the unknown sample, the *probable error* ( $q_z$ ) of the  $f(x, y) = z$  function was chosen.

Due to the manipulations the following equation was obtained:

$$\frac{q \Theta}{\Theta} = \ln A \frac{T}{W}$$

The combined nomographs made by this afore-said equation are showed in Figure 3.

For the estimation of error of the assay using nomograph II four values are necessary namely  $V$ ,  $W$ ,  $R_v$  and  $R_w$ .

$R_v$  and  $R_w$  are  $V$  and  $W$  values within a series of measurement (absolute error) i. e. the differences between the highest and lowest  $V$  and  $W$  values respectively.

Connecting the  $V$  and  $W$  values with a straight line (1), this one intersects the  $E$  scale in a point. Connecting this point with the  $R_w$  value (2), the resulted straight line is lengthened towards the  $V$  scale where it marks a point  $A$ .

Dropping perpendiculars on the scale  $V$  (3) and on the scale  $R_v$  (3a) using the  $R_v$  value a point of intersection is obtained which corresponds to one of the  $G$  curves.

Connecting the point of intersection of  $G$  curve on the  $V$  scale with the  $W$  value (4) the straight line intersects again the  $E$  scale and denotes a value which is in this case the percentual probable error of the assay.

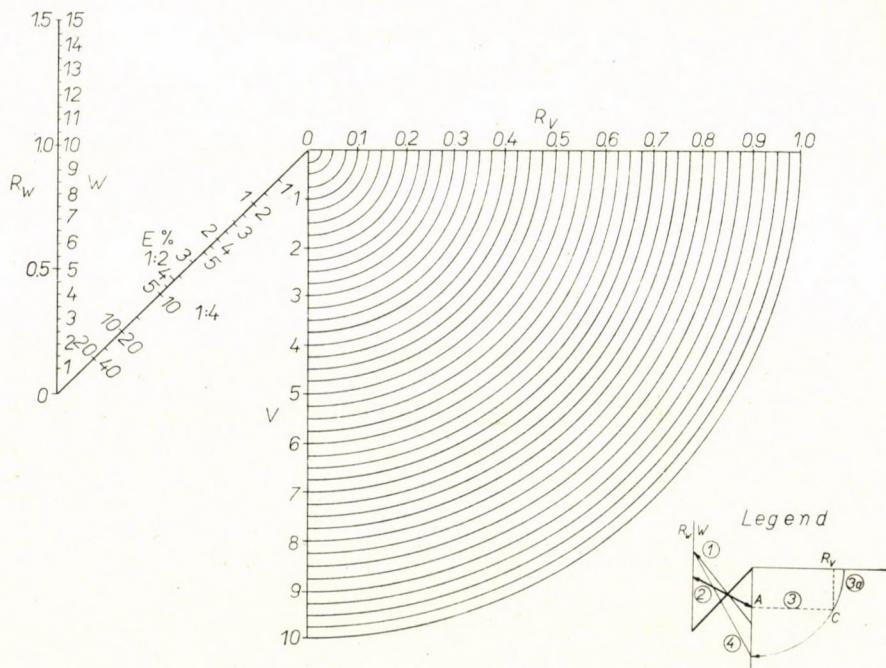


Fig. 3. Nomograph for the estimation of probable error

### Discussion

When elaborating the bio-assay of primycin there were various factors we had to take into consideration. Thus we had to choose

1. the suitable solid medium,
2. the test microorganism,
3. the best buffer or solvent system,
4. the temperature of incubation.

Besides these we had to prove the applicability of the method for special estimations as the quantitative determination of the activity of fermentation juices, intermediary products, body fluids and organs.

Experiences obtained during the preliminary investigations proved that the diffusion of primycin is inhibited by the high protein, glucose and peptone contents of the medium. After having eliminated the glucose we diminished the percentual content of protein and peptone.

Because of the alkaline character of the antibiotic the addition of alkaline substances ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) seemed to be necessary. The optimal concentration of agar-agar in the basal medium (2%) depended on two factors: the solidity of the medium and the possibility of diffusion of primycin in the polysaccharide agar-agar.

Choosing the test microorganism we had to consider the relatively high pH value and low concentration of nutritive materials of the basal medium. Therefore disregarding the use of *Staphylococcus aureus* DUNCAN strain a less-exacting strain of *Bacillus subtilis* was employed.

With the increasing pH value of the investigated buffers not only the agar-diffusion of antibiotic improved but even the Liesegang-ring like inhibition zones (characteristic of the poor buffer effect) disappeared.

Similarly, the sharpness of the edge of inhibition zones was the best at pH 8,0 value.

Testing various organic solvents (alcohols, acetone) and detergents (TWEEN 80, CRILLS) and their mixtures with pH 8.0 buffer to ensure the best diffusion of primycin in the agar medium we have finally chosen a methanol-pH 8.0 phosphate buffer mixture (ratio 1 : 1), the best.

Being a good solvent for primycin the methanol increased not only the rate of diffusion but even eluted the adsorbed part of the antibiotic from the mycelia.

50% methanol in itself did not effect the growth of the applied strain of *Bacillus subtilis*.

In the view of rate of diffusion of primycin and the rate of growth of *Bacillus subtilis* the temperature of incubation was optimal at 37° C.

The adaptability of the method for the estimation of special materials containing primycin encountered some difficulties.

Primycin is strongly adsorbed to mycelia. Similar phenomenon was observed on tissues (lung, kidney) too. The unpurified intermediary products of primycin contained apparent amount of ninhydrin positive material. During the purification process this content was diminished. Hereby the assay of the antibiotic became easier.

These facts indicated the affinity of primycin to make certain linkage with proteins. The adsorbed primycin lost the ability of optimal diffusion.

We had to liberate the primycin from the complex and prevent its rebinding to protein during incubation.

Among various solvents the distilled methanol seemed to be the best for this purpose. Besides, our endeavour was to assure the most advantageous con-

ditions for the rapid diffusion. Nevertheless, considering the difference in the recoveries in successive estimations of various kinds of samples we had to suppose the existence of different sorts of protein-primycin linkages.

The error of the method was generally  $\pm 2-7$  per cent. Within this error of the bio-assay there was a possibility to follow the changes of the active material during the course of fermentation and preparative processes [1].

The concentration of primycin in organs was not measurable within the mentioned limits of error. The reason might be the low concentration of the antibiotic in the organs and the probably insufficient splitting of the protein-primycin complex.

In these determinations we had to use the term "unit". As even the highly purified products were not crystalline, for practical purposes we had to define the "unit of primycin". The "unit" was expressed by that amount of active material that caused an inhibition zone of 17 mm in diameter in average of no less than 48 measurements.

We had a purified standard product of which a solution containing 1,0  $\gamma/ml$  primycin caused the requested diameter of inhibition zone. This standard compound contained "1000 units" per milligram.

It was obvious that a smaller amount of a purer standard material would give the same zone of inhibition. In the course of purification purer products were obtained of which activity could be expressed by a value over 100 per cent [1].

#### Acknowledgement

The author is indebted to Mr. A. KÁNTOR (Mathematical Institute of L. KOSSUTH University, Debrecen) for his advices and help in construction of nomographs.

#### LITERATURE

1. CSOBÁN, Gy., LENGYEL, Z., NYIRI, L., PÓLYA, K., SOLTÉSZ, J., SZTARICKAI, F. (1960) Tapasztalatok a primycin fermentációjával és feldolgozásával kapcsolatban. Experiences on the fermentation and preparative processes of primycin. *Acta Pharmaceutica Hung.*, (In press). (In Hungarian.)
2. FLOREY, H. W., CHAIN, E., HEATLEY, N. G., JENNINGS, M. P., SANDERS, A. G., ABRAHAM, E. P., FLOREY, M. E. (1949) Antibiotics. Oxford, Univ. Press.
3. NYIRI, L., (1958) A rapid biological test for determining oxytetracycline and chlortetracycline activity. *Acta Microbiol. Hung.*, 5, 147—150.
4. Official Method of U S Food and Drug Administration for the assay of penicillin (1947).
5. SZABÓ, G., VÁLYI-NAGY, T. (1958) A method to measure the production of antibiotic substance by the variants of *Streptomyces griseus*. *Acta Microbiol. Hung.*, 5, 2—10.
6. SZILÁGYI, I., SZABÓ, I. (1958) Mikrokémiai módszer SAKAGUCHI-pozitív antibiotikumok meghatározására. A microchemical method for determining SAKAGUCHI-positive antibiotics. *MTA. Biol. és Orv. Tud. Oszt. Közl.*, 9, 141—149. (In Hungarian.)
7. VÁLYI-NAGY, T., URI, J., SZILÁGYI, I. (1954) Primycin, a new antibiotic. *Nature*, 147, 1105.

### BIOLOGISCHE BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT VON PRIMYCIN

Zur quantitativen Bestimmung der Aktivität von Primycin wurde eine biologische Methode ausgearbeitet. Die Aktivität dieses schwer diffundierenden, basische Eigenschaften besitzenden Antibiotikums wurde mit Hilfe eines *Bacillus subtilis*-Stammes bestimmt, wobei ein Nähragar mit verhältnismäßig geringem Protein- und Peptongehalt, und zur Verdünnung ein Methanol-Phosphatpuffergemisch (pH 8.0) zur Verwendung gelangte. Die Bestimmung des Wirkstoffgehaltes erfolgte mittels der bereits früher beschriebenen »two-dose assay« Methode auf speziellen Nomogrammen.

Zur Fehlerberechnung wurde eine schnelle Methode ausgearbeitet. Die Fehler schwanken von 2—7%.

Die neue Methode konnte mit Erfolg zur Beobachtung der Aktivitätsveränderungen von Primycin während den Fermentationen und Reinigungsprozessen verwendet werden.

### БИОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРИМИЦИНА

Для количественного определения активности примицина авторы разработали биологический метод. Активность этого трудно диффундирующего, обладающего свойствами основания антибиотика была определена штаммом *Bacillus subtilis* причем применялась агаровая среда, содержащая сравнительно мало протеина и пептона, далее для разбавления в качестве буферной смеси применялся металон-fosfat (рН 8.0). Определение содержания действующего вещества осуществлялось на специальных номограммах описанным уже раньше методом "two-dose assay".

Для вычисления ошибок был разработан скоростной метод. Погрешность измерения колебалась от 2—7%.

Разработанный авторами метод применим для прослеживания изменений активности примицина в ходе процессов ферментации и очистки.

LÁSZLÓ NYIRI, Debrecen, Pallagi út 3—5., Hungary.

# EXPERIMENTS ON THE CARBONATE ASSIMILATION OF SOME UNICELLULAR ALGAE BY RUTTNER'S CONDUCTOMETRIC METHOD

L. J. M. FELFÖLDY

BIOLOGICAL RESEARCH INSTITUTE OF THE HUNGARIAN ACADEMY OF SCIENCES, TIHANY  
(HEAD: E. WOYNÁROVICH)

(Received February 2, 1960)

## Summary

Photosynthetic experiments were made by RUTTNER's conductometric method in a 3mM  $\text{KHCO}_3$  solution, with pure cultures of five strains of green algae (7 K. *Chlorella vulgaris* BEYER., 516. *Kirchneriella* sp., 198. *Scenedesmus quadricauda* (TURP.) BRÉB., 953. *Coelastrum microporum* NÄG., 3153. *Chlorocloster terrestris* PASCHER).

One of these strains (*Chlorella*) utilizes free carbon dioxide much better, than hydrocarbonate ions, although it can take up the latter too in a limited quantity (up to pH 9.5).

One strain (*Scenedesmus*) utilizes hydrocarbonate ions well, but is unable to decrease the  $\text{CO}_2$  content of the 3 mM  $\text{KHCO}_3$  solution to the point, where the quantity of carbonate ions predominate over hydrocarbonate ions.

The other three species show very intensive photosynthesis even at pH values, indicating very low hydrocarbonate concentration. It is possible that these species are able to split carbonate ions too.

The behaviour of these strains, originating from carbonate containing waters suggest that at the calculation of the primary productivity of natural waters not only the free carbon dioxide and the half amount of the hydrocarbonates must be considered as available inorganic carbon sources, but the total amount of chemically determined hydrocarbonate ions and the half amount of carbonates too. In extreme cases, some algal species are able to take up 93% of the carbon dioxide content bound to hydrocarbonates and carbonates. This process is presumably limited by the increase of pH.

On the basis of these experiments the high productivity of sodic waters can be easily explained.

## Introduction

There are certain hydrobiological problems, which raised our interest to study the inorganic carbon sources of phytoplankters.

The attention of hydrobiologists was called at first by MAUCHA [5, 6, 7] to the importance of inorganic carbon supply of phytoplankton, assuming that under certain conditions the carbon sources of photosynthesis can be a limiting factor in the biological productivity of some freshwater bodies.

Though in the hydrobiology since RASPAIL [15] the assessment of primary productivity has been made on the basis of free carbon dioxide and the half amount of carbon present in hydrocarbonates, the productivity of the very alkaline water bodies rich in soda, which are of wide-spread occurrence in Hungary, is very high, though they do not contain free  $\text{CO}_2$ . This contradiction urges a plant physiological revision of this chemical-ecological question.

According to literary data there are two types of submersed plants with different behaviours towards inorganic carbon sources. The mosses [3, 14, 15, 16, 12, 13] and certain green algae [8, 9] can use carbon dioxide only in its free form, some aquatic plants and algae, however, can utilize the bicarbonate ions too [14, 15, 12, 13, 8, 9, 4]. While the physiology of higher plants has been completely examined in this respect, there are only few data concerning planktonic algae [17, 4 etc.].

#### Materials and methods

The following bacteria-free strains of unicellular algae isolated in our laboratory were used for the experiments.

- 7K. *Chlorella vulgaris* BEYER. Isolated from Lake Balaton, 14th January 1954.
- 516. *Kirchneriella* sp. From Lake Balaton, 19th August, 1955.
- 198. *Scenedesmus quadricauda* (TURP.) BRÉB. From Lake Balaton, 2nd March 1955.
- 953. *Coelastrum microporum* NÄG. From Lake Balaton, 19th August 1955.
- 3153. *Chlorocloster terrestris* PASCHER. From a garden soil at Tihany, 6th November 1957.

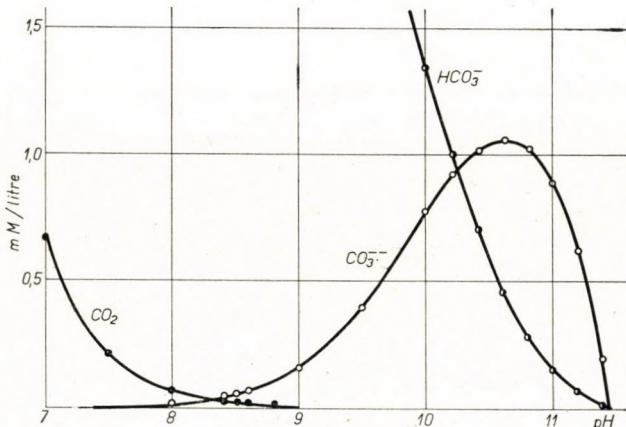


Fig. 1. Concentrations of various carbonic acid forms in a 3 mM/litre KOH solution at various pH values when pH is lowered by adding carbon dioxide to the solution

The bacteria-free cultures are kept in a northern window, in test tubes on agar slants containing glucose, peptone, yeast hydrolizate and the inorganic salts of Knop-Pringsheim nutrient solution [11, p. 35]. The algal material necessary for the experiments was cultured in 2 litre Erlenmeyer flasks containing 1 litre Knop-Pringsheim nutrient solution. The culture vessels were illuminated by incandescent lamps, cca 7000 Lux, at a temperature of 25–30°C and were aerated with 3%  $\text{CO}_2$  in air. When the cultures were 2–4 weeks old, aliquots from them were washed three times by centrifuging with a 3 mM  $\text{KHCO}_3$  solution. In the suspension prepared in this way the cell number was determined by a Bürker hemocytometer.

The algal suspensions were exposed in glass stoppered vessels at  $25.0 \pm 1^\circ\text{C}$  in a thermostat and were illuminated by a 300 W incandescent lamp (5200 Lux) cooled with a water screen. During exposition the samples were several times shaken up. The change in the composition of the  $\text{KHCO}_3$  solution during photosynthesis was measured conductometrically by RUTTNER's method [13]. The conductometric measurements were made by an electronic "Resistoscope" type HRE 13–58 (Híradástechnikai KTSz-Budapest) and by an electrode with a capacity of  $C = 0.054$ . The pH of the samples was measured with a "pH" Electrometer type 2512" (Orion-Budapest) using a glass electrode. The apparatus was calibrated with stand-

ard acetate, Sörensen's phosphate [2] and Atkins-Pantin buffer solutions [1] before each series of measurements.

The calculations of the carbonic acid components present in the solutions were made partly by RUTTNER's [13] nomogram, partly they were calculated from the changes taking place in the pH of the solutions with the help of the dissociation constants of carbonic acid (Fig. 1).

### Experiments

Previous to the experiments some methodical questions had to be solved. At first it had to be examined, whether the conductivity of the 3 mM  $\text{KHCO}_3$  solution is markedly changed by the suspended cells or do the cells influence the accuracy of the measurements?

When cells of *Coelastrum microporum*, washed three times previously, are suspended in different quantities in a  $\text{KHCO}_3$  solution of a conductivity  $K_{18} = 3.14 \cdot 10^{-4}$ , the conductivity of the suspensions slightly rises with the increase in cell number:

cells/ $\mu\text{l}$	$K_{18} \cdot 10^{-4}$
500	3.15
1000	3.19
5000	3.20
10000	3.20

As it is seen, the differences, which may be attributed either to nutrient salts remaining behind in traces from the original nutrient solution or to substances secreted by the cells themselves, are so small that they can be easily neglected.

In apparatus in which a telephone receiver is used to determine the point of minimum sound, at the breaking off of the electric current in the Wheatstone-bridge, the measurements are disturbed by suspensions containing more than 1000 cells per microlitre. When using, however, an electronic instrument in which the telephone receiver is replaced with a cathode-ray tube (magic eye) and the point of balance can be detected visually, no anomalies caused by suspended cells were experienced.

Another important task was to determine which concentration of cells would be the most suitable in these photosynthetic experiments. In Fig. 2 the photosynthetic activities of *Coelastrum microporum* suspensions, containing 900, 6400 and 10000 cells/ $\mu\text{l}$  are graphed. On the abscissa the time is given in hours, on the ordinate the  $\text{CO}_2$  deficiency referring to the  $\text{CO}_2$  content of a 3 mM  $\text{KHCO}_3$  solution. The quantities marked with plus refer to free  $\text{CO}_2$ , those with minus to the amount of  $\text{CO}_2$ , splitting off from the  $\text{KHCO}_3$  itself, expressed in mg/l units. To determine the carbon forms available for *Coelastrum microporum*, only suspensions with 6400 resp. 10,000 cells/ $\mu\text{l}$  are suitable, because the photosynthetic rate in suspensions of lower cell density does not stop even

after 50 hours. Photosynthetic activity is not proportional with cell number, consequently experiments of such nature can be only qualitatively interpreted. (In too dense suspensions the algal cells shade each other.) Preliminary experiments are necessary to determine the most suitable density of suspension for the different strains.

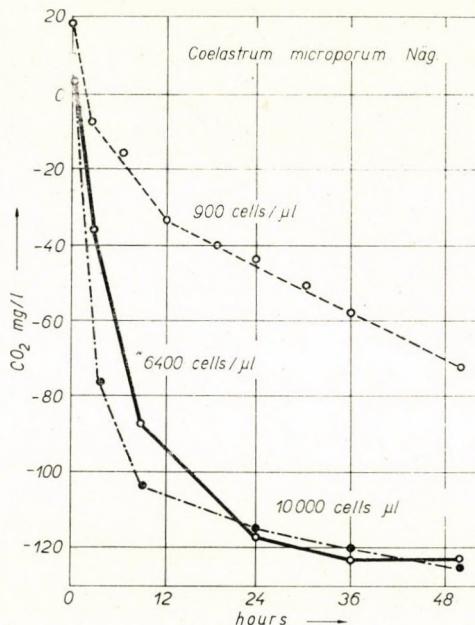


Fig. 2. Rate of carbon dioxide uptake from the 3 mM/l  $\text{KHCO}_3$  solution by algal suspensions of different densities (900, 6400 and 10 000 *Coelastrum microporum* cells per microlitre)

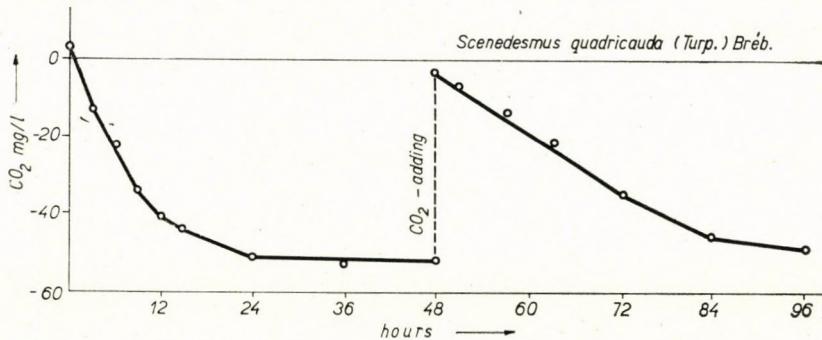


Fig. 3. Carbon dioxide uptake of *Scenedesmus quadricauda* from the 3 mM/l  $\text{KHCO}_3$  solution before and after addition of  $\text{CO}_2$  by bubbling exhaled air

Working in an ideal solution of pure  $\text{KHCO}_3$ , it must be investigated if the cessation of photosynthesis could be caused by the depletion of carbon sources or of some other nutrient elements?

A suspension containing 1186 cells/ $\mu\text{l}$  was made from *Scenedesmus quadricauda* in a 3 mM KHCO<sub>3</sub> solution. The curve of photosynthesis runs into horizontal direction after 24 hours (Fig. 3). Thereafter exhalation air was bubbled through the solution, by which its 39% carbon dioxide deficiency ( $-51.6 \text{ mg/l}$ ) was reduced to 2.4% ( $-3.2 \text{ mg/l}$ ). In the new exposition there was again carbon

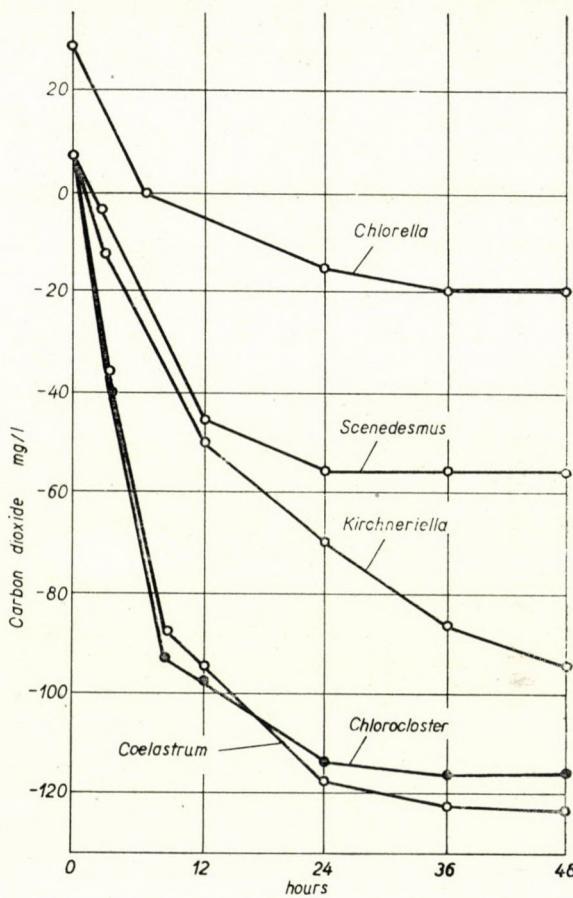


Fig. 4. Carbon dioxide uptake of five different algal species from the 3 mM/l KHCO<sub>3</sub> solution (explanation see in the text)

dioxide uptake, but it was not so pronounced as in the first exposition. The assumption, therefore, that the photosynthetic process stops due to the depletion of nutritive reserves has to be rejected, and it seems more probable that the uptake of carbonic acid components is stopped either by the exhaustion of available carbon source or by the unfavourable change in hydrogen ion concentration.

Fig. 4 shows the carbon dioxide uptake of five different algal species in a 3 mM KHCO<sub>3</sub> solution. The behaviour of the different species, as it is seen from the graph, are:

**7K. *Chlorella vulgaris* BEYER.**

Time of experiment: 25th February 1957; concentration: 3050 cells/ $\mu$ l. This strain utilizes carbon dioxide very well, but after its consumption the rate of photosynthesis decreases and stops after 36—50 hours. The physico-chemical properties of the limiting solution are: CO<sub>2</sub> deficiency = —20 mg/l based on the total CO<sub>2</sub> content of 1 litre 3 mM KHCO<sub>3</sub> solution (14.2%), K<sub>18</sub> =  $3.11 \cdot 10^{-4}$ , pH = 9.50, C<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 0.0015 mM/l, C<sub>HCO<sub>3</sub></sub> = 2.18 mM/l, C<sub>CO<sub>3</sub></sub> = 0.39 mM/l.

**198. *Scenedesmus quadricauda* (TURP.) BRÉB.**

Time of experiment: 19—21th August 1958, concentration of cells: 2130 cells/ $\mu$ l. In the first 12 hours there was an intense photosynthesis, but it stopped after 21 hours. At the limiting state a —56 mg/l carbon dioxide deficiency (42.4%) was found. K<sub>18</sub> =  $3.53 \cdot 10^{-4}$ , pH = 10.3, C<sub>CO<sub>2</sub></sub> =  $6 \cdot 10^{-5}$  mM/l, C<sub>HCO<sub>3</sub></sub> = 0.70 mM/l, C<sub>CO<sub>3</sub></sub> = 1.02 mM/l.

**516. *Kirchneriella* sp.**

Time: 12—21 August 1958, cell concentration = 9020 cells/ $\mu$ l. Photosynthesis did not stop even after 50 hours, which points to a limited photosynthetic activity. However, on the basis of these experiments the degree to which this strain is capable of utilizing the carbon sources of a 3 mM KHCO<sub>3</sub> solution cannot be determined. The carbon dioxide deficiency of the solution in which *Kirchneriella* photosynthetized for fifty hours was 71.1%, pH = 11.1, K<sub>18</sub> =  $4.80 \cdot 10^{-4}$ , C<sub>CO<sub>2</sub></sub> <  $3 \cdot 10^{-6}$  mM/l, C<sub>HCO<sub>3</sub></sub> = 0.11 mM/l, C<sub>CO<sub>3</sub></sub> = 0.78 mM/l.

**3153. *Chlorocloster terrestris* PASCHER.**

Time: 19—21 August 1958, density of cells = 6320 cells/ $\mu$ l. In 24 hours this strain has utilized more than 85% of the CO<sub>2</sub> content of the 3 mM KHCO<sub>3</sub> solution. After 36 hours photosynthetic activity stopped, establishing a solution of —115.5 mg/l carbon dioxide deficiency (87.5%). pH = 11.3, K<sub>18</sub> =  $5.94 \cdot 10^{-4}$ , C<sub>CO<sub>2</sub></sub> <  $9 \cdot 10^{-7}$  mM/l, C<sub>HCO<sub>3</sub></sub> = 0.03 mM/l, C<sub>CO<sub>3</sub></sub> = 0.39 mM/l.

**953. *Coelastrum microporum* NÄG.**

Time of experiment: 19—21 August 1958, density of cells: 6420 cells/ $\mu$ l. The photosynthetic activity of this strain is similar to that of *Chlorocloster*, but

it can even better utilize the carbon dioxide supplies of the 3 mM KHCO<sub>3</sub> solution. The characteristics of the limiting solution are: carbon dioxide deficiency = -122.5 mg CO<sub>2</sub>/l (92.9%), pH = 11.4, K<sub>18</sub> = 6.30 · 10<sup>-4</sup>, C<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 9 · 10<sup>-8</sup> mM/l, C<sub>KHCO<sub>3</sub></sub> = 0.01 mM/l, C<sub>CO<sub>3</sub></sub> = 0.15 mM/l.

### Discussion

From the results of these experiments the most important is the perception that the inorganic carbon content of the 3 mM KHCO<sub>3</sub> solution is differently utilized by the various algal species.

Of the species investigated, there is none that utilizes free carbon dioxide only, as even the least basophilic *Chlorella* can photosynthetize about pH 9. That *Chlorella pyrenoidosa* strain, which was used in ÖSTERLIND's experiments [9, p. 357] could not utilize bicarbonates. As it is seen in Fig. 4 the photosynthetic rate of *Chlorella* is much greater in the presence of free CO<sub>2</sub>, than in its absence.

The utilization of the hydrocarbonate ions is limited in the case of *Scenedesmus quadricauda*. This strain cannot assimilate above pH 10.23, where the amount of hydrocarbonate and carbonate ions is about equal. The results of our experiments agree very well with those obtained by ÖSTERLIND [8].

The photosynthetic capacity of the *Kirchneriella* suspension examined was weaker. This strain could take up the carbon content of the 3 mM KHCO<sub>3</sub> solution much better, than *Scenedesmus*.

Two strains, *Chlorocloster terrestris* and *Coelastrum microporum* belong to the same photosynthetic type. Their pH tolerance is great and they leave only 8–10% of the total CO<sub>2</sub> content in solution. There are in the limiting solution: 0.003 γ/l dissociated CO<sub>2</sub>, 0.61 mg/l HCO<sub>3</sub> ions and 9 mg CO<sub>3</sub> per litre. At a carbon dioxide deficiency of -93 mg/l (70.5%) at pH 11.1, where the photosynthesis of *Chlorocloster* and *Coelastrum* is still pronounced, there are 0.1 mM HCO<sub>3</sub> and 0.78 mM CO<sub>3</sub> ions, which is equal to 6.1 mg/l HCO<sub>3</sub> and 46.8 mg/l CO<sub>3</sub> ions.

It would not be perhaps an exaggerated assumption that these organisms are capable of utilizing the carbonate ions too, while the pH of the suspension raises to 11.4 due to the appearance of OH-ions.

Evaluating these experiments from hydrobiological point of view, we may establish that in the calculation of the primary productivity of natural waters not only the chemically determined free carbon dioxide and the half amount of hydrocarbonates are to be considered as available inorganic carbon sources, but also the chemically obtained total amount of hydrocarbonates and at least the half amount of carbonates. The photosynthetic activity of algae growing in solutions in which carbonates predominate, is limited presumably

by the decrease of hydrogen ion concentration [4, p. 106]. It seems to be a plausible assumption that in carbonate-containing water bodies the main role is played by algae, which similarly to *Coelastrum* and *Chlorocloster* are capable of utilizing probably carbonate ions too at a very high pH and in the presence of very low hydrocarbonate content. On the basis of these experiments the high productivity of sodic waters can easily be understood.

Some physiological and ecological aspects based on these results are under investigation.

#### LITERATURE

1. ATKINS, W. R. G., PANTIN, C. F. A. (1926) A buffer mixture for the alkaline range of hydrogen ion concentration determinations. *Biochem. J.*, **20**, 102—106.
2. FUHRMANN, F. (1941) Elektrometrische pH-Messung mit kleinen Lösungsmengen. Springer, Wien.
3. JAMES, W. O. (1928) Experimental researches on vegetable assimilation and respiration. XIX. The effect of variations of carbon dioxide supply upon the rate of assimilation of submerged water plants. *Proc. Roy. Soc. London*, **103**, (B721), 1—42.
4. LORENZEN, H. (1958) pH-Wert und Kohlenstoffversorgung bei Wachstum und Photosynthese von Grünalgen. *Flora*, **146**, 94—108.
5. MAUCHA, R. (1924) Upon the influence of temperature and intensity of light on the photosynthetic production of nanoplankton. *Verh. Int. Ver. Limnol.*, **2**, 381—401.
6. MAUCHA, R. (1927) Zur Theorie des Assimilations- und Dissimulationsvorganges des Phytonanoplanktons. *Internat. Rev. ges. Hydrobiol. Hydrogr.*, **17**, 239—248.
7. MAUCHA, R. (1958) Zur Frage der Produktionsbiologie der Seen. *Verh. Int. Ver. Limnol.*, **13**, 212—216.
8. ÖSTERLIND, S. (1949) Growth conditions of the alga *Scenedesmus quadricauda* with special reference to the inorganic carbon sources. *Symb. Bot. Upsal.*, **10**, (3), 1—141.
9. ÖSTERLIND, S. (1950) Inorganic carbon sources of green algae. I. Growth experiments with *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol. Plant.*, **3**, 353—360.
10. ÖSTERLIND, S. (1951) Inorganic carbon sources of green algae. III. Measurements of photosynthesis in *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol. Plant.*, **4**, 242—254.
11. PRINGSHEIM, E. G. (1946) Pure cultures of algae, their preparation and maintenance. Univ. Press, Cambridge.
12. RUTTNER, F. (1947) Zur Frage der Karbonatassimilation der Wasserpflanzen. I. Die beiden Haupttypen der Kohlenstoffaufnahme. *Österr. Bot. Z.*, **94**, 266—294.
13. RUTTNER, F. (1948) Zur Frage der Karbonatassimilation der Wasserpflanzen. II. Das Verhalten von *Eloea canadensis* und *Fontinalis antipyretica* in Lösungen von Natriumbzw. Kaliumbikarbonat. *Österr. Bot. Z.*, **95**, 208—238.
14. STEEMANN NIELSEN, E. (1946) Carbon sources in the photosynthesis of aquatic plants. *Nature*, **158**, 594—596.
15. STEEMANN NIELSEN, E. (1947) Photosynthesis of aquatic plants with special reference to the carbon sources. *Dansk Bot. Ark.*, **12** (8), 1—71.
16. STEEMANN Nielsen, E. (1952) The persistence of aquatic plants to extreme pH values. *Physiol. Plant.*, **5**, 211—217.
17. WARBURG, O. (1954) Über die Berücksichtigung der Retention der Kohlensäure bei Messungen der Photosynthese in Kulturlösungen. *Z. Naturforsch.*, **9b**, 302—303.

#### KARBONATASSIMILATIONSVERSUCHE AN EINZELLIGEN ALGEN MIT DER KONDUKTOMETRISCHEN METHODE VON RUTTNER

An Reinkulturen von fünf Grünalgenstämmen (7K. *Chlorella vulgaris* BEYER., 516. *Kirchneriella* sp., 198. *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) BRÉB., 953. *Coelastrum microporum* NÄG., 3153. *Chlorocloster terrestre* PASCHER) wurden in einer 3 mM KHCO<sub>3</sub> Lösung Photosyntheseversuche mit der Ruttnerschen konduktometrischen Methode durchgeführt.

*Chlorella* assimiliert freies Kohlendioxid viel besser als Hydrokarbonatione, obwohl diese Alge auch die letzteren in geringem Maße zu assimilieren vermag (bis zu pH 9,5).

*Scenedesmus* verwertet die Hydrokarbonatione gut, während es den CO<sub>2</sub>-Gehalt in der 3 mM KHCO<sub>3</sub> Lösung nicht bis zu jenem Punkt zu vermindern vermag, wo die Menge der Karbonatione größer ist als die Zahl der Hydrokarbonatione.

Die übrigen drei Arten photosynthetisieren sehr intensiv, selbst bei solchen pH-Werten, die eine äußerst niedrige Hydrokarbonatkonzentration anzeigen. Vermutlich vermögen diese Arten auch die Karbonationen zu spalten.

Diese aus karbonathaltigen Gewässern stammenden Arten weisen darauf hin, daß bei der Berechnung der primären Produktionsfähigkeit von natürlichen Gewässern nicht nur das freie Kohlendioxyd und die Hälfte der Hydrokarbonate als vorhandene Kohlenstoffquellen berücksichtigt werden müssen, vielmehr auch sämtliche chemisch bestimmten Hydrokarbonationen und die Hälfte der Karbonate. In extremen Fällen vermögen einige Algenarten 93% des an Hydrokarbonat und Karbonat gebundenen Kohlendioxys zu assimilieren. Dieser Prozeß wird vermutlich durch die Erhöhung des pH-Wertes begrenzt.

### ОПЫТЫ ПО АССИМИЛЯЦИИ КАРБОНАТА ОДНОКЛЕТОЧНЫМИ ВОДОРОСЛЯМИ ПРИ ПОМОЩИ КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА РУТТЕРНА

При помощи кондуктометрического метода Руттнера проводились опыты по фотосинтезу в растворе 3 mM KHCO<sub>3</sub> с чистыми культурами пяти штаммов зеленых водорослей. (7K. *Chlorella vulgaris* BEYER., 516. *Kirchneriella* sp., 198. *Scenedesmus quadricauda* (TURP.) BRÉB., 953. *Coelastrum microporum* NÄG., 3153. *Chlorocloster terrestris* PASCHER.)

*Chlorella* гораздо лучше ассимилирует свободную двуокись углерода, чем ионы гидрокарбоната, хотя эта водоросль способна в небольшой мере (до pH 9,5) ассимилировать и последние.

*Scenedesmus* хорошо ассимилирует ионы гидрокарбоната, но не в состоянии уменьшить содержания CO<sub>2</sub> в растворе 3 mM KHCO<sub>3</sub> до такой степени, когда число ионов карбоната больше числа ионов гидрокарбоната.

Остальные три вида фотосинтезируют весьма интенсивно, даже при таких pH, при которых имеется весьма низкая концентрация гидрокарбоната: Весьма вероятно, что эти виды способны расщеплять также ионы карбоната.

Эти, виды водорослей, происходящих из содержащих карбонаты вод, указывают на то, что при вычислении первичной продуктивности естественных вод необходимо учитывать не только свободную двуокись углерода и половину гидрокарбоната в качестве имеющихся в распоряжении источников углерода, но и все химически определенные ионы гидрокарбоната и половину карбонатов. В крайних случаях несколько видов водорослей способны ассимилировать 93% содержания связанный карбонатом и гидрокарбонатом двуокиси углерода. Данный процесс предположительно ограничивается повышением pH.

На основании проведенных опытов легко можно объяснить высокую продуктивность засоленных вод.

LAJOS J. M. FELFÖLDY, Tihany, Biologia, Hungary.

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója

Műszaki szerkesztő: Farkas Sándor

A kézirat nyomdába érkezett: 1960. V. 11. — Terjedelem: 6,50 (A/5) ív, 42 ábra (4 színes), I melléklet

---

1960.51339 — Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György

The *Acta Biologica* publish papers on biological subjects in English, German, French and Russian.

The *Acta Biologica* appear in parts of varying size, making up volumes.  
Manuscripts should be addressed to :

*Acta Biologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.*

Correspondence with the editors and publishers should be sent to the same address.

The rate of subscription to the *Acta Biologica* is 110 forints a volume. Orders may be placed with "Kultura" Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

---

Les *Acta Biologica* paraissent en français, allemand, anglais et russe et publient des travaux du domaine des sciences biologiques.

Les *Acta Biologica* sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en volumes. On est prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction à l'adresse suivante :

*Acta Biologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.*

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise pour le Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultura» (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

---

«*Acta Biologica*» публикуют трактаты из области биологии на русском, немецком, английском и французском языках.

«*Acta Biologica*» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи следует направлять по адресу:

*Acta Biologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.*

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции и администрации.

Подписьная цена «*Acta Biologica*» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «Kultura» (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Текущий счет 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

## INDEX

Csabay, L.—Horváth, L.—Ferencz, A.: Studies on the O <sub>2</sub> consumption of chick embryos by a modified Warburg method .....	1
Kovács, J.: Cytophysiological studies on the Leydig cells of mouse testis .....	7
Jámbor, B.—Dévay, M.: Changes in the activity of dehydrogenases during storage of yeast .....	15
Vigh, B.: Über die Regeneration der Augenlinse des Rippenmolches ( <i>Pleurodeles waltl</i> ) .....	25
Gyéval, A. T.: Herzstudien. III. Histologische und histochemische Untersuchungen am Herzen von <i>Abramis brama</i> .....	35
Faludi, B.—Faludi-Dániel, Á.: Role of the alterations in phosphorous metabolism in resistance to dichlorophenoxyacetic acid .....	43
Nyiri, L.: The bio-assay of primycin .....	57
Felföldy, L. J. M.: Experiments on the carbonate assimilation of some unicellular algae by Ruttner's conductometric method .....	67

ACTA  
BIOLOGICA  
ACADEMIAE SCIENTIARUM  
HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

B. FALUDI, V. FRENYÓ, B. GYÖRFFY, J. SZENTÁGOTHAI,  
A. TIGYI, J. TIGYI

REDIGIT

I. TÖRŐ

TOMUS XI

FASCICULUS 2



1960

ACTA BIOL. HUNG.

# ACTA BIOLOGICA

## A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA BIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTŐSÉG : BUDAPEST IX., TŰZOLTÓ U. 58. KIADÓHIVATAL : BUDAPEST V., ALKOTMÁNY U. 21.

Az *Acta Biologica* angol, francia, német és orosz nyelven közöl értekezéseket a biológia köréből.

Az *Acta Biologica* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet. Évenként 1–2 kötet jelenik meg.

A közlésre szánt kéziratok a következő címre küldendők:

*Acta Biologica* szerkesztősége, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi és kiadóhivatali levelezés.

Az *Acta Biologica* előfizetési ára kötetenként belföldre 80 Ft, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-46), a külföld számára pedig a „Kultúra” Könyv- és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Bankszámla : 43-790-057-181) vagy annak külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

---

Die *Acta Biologica* veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereich der biologischen Wissenschaften in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die *Acta Biologica* erscheinen in Heften wechselnden Umfangs. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an folgende Adresse zu senden :

*Acta Biologica*, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

An die gleiche Anschrift ist auch jede Korrespondenz für die Redaktion und den Verlag zu senden.

Abonnementspreis pro Band : 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Außenhandels-Unternehmen »Kultura« (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Bankkonto No. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

# CALCULATION OF UNDERWATER DISTRIBUTION OF RADIANT ENERGY AS A PROBLEM OF PRODUCTION BIOLOGY\*

ZSUZSA T. DVIGHALLY

HUNGARIAN DANUBE RESEARCH STATION, ALSÓGÖD (HEAD: E. DUDICH)

(Received October 30, 1959)

## Summary

A method is exposed, by which one of the basic problems of biological production in natural waters is solved — the exact calculation of the radiant energy passing under the surface of water.

The measurement of radiant energy, entering into water was until now an unsolved problem, because energy-measuring devices cannot be applied in underwater conditions. In such cases generally photo-electrical illumination-meters are used, and the energetical conditions are deduced from the electromotive force. But illumination is not proportional to radiant energy, so data read from scale of the illumination-meter (luxmeter) must be corrected by a new factor, which is the reciprocal value of the product of relative visibility and relative radiant energy. This corrected value is strictly proportional to the real quantity of underwater radiant energy.

## Introduction

The energy fixed during photosynthesis originates from the radiant energy of the sun. Because of the selective absorbing capacity of the atmosphere, however, not the total spectrum of energy is taken into consideration in hydrobiological or (in the strict sense of the word) production-biological investigations, but only that portion of radiant energy which reaches the surface of the Earth through the so-called "optical window"; the bulk of the energy arrives in form of visible and infrared radiation.

The measurement of radiant energy, reaching the surface of the Earth is not difficult if appropriate devices are applied, *e. g.* bolometers, thermopiles or similar instruments. Direct measurement of underwater radiant energy, however, encounters difficulties. Under such circumstances an indirect method of measurement is generally chosen: photoelectric measuring instruments, generally selenium-photoelements are used, and the quantity of energy is inferred from electromotive force or voltage given by the element. Colour-filters may also be placed before the cell, and thus conclusions can be drawn concerning the energy of different sections of the spectrum.

\* Paper presented at the 3rd Meeting of Hungarian Hydrobiologists, Tihany, September 9, 1959.

Owing to the above-mentioned technical difficulties, in the course of limnological and marine investigations no direct measurements of the *energy*, penetrating into deeper layers of the water, have been carried out; on the other hand, several measurements were made concerning the *intensity of illumination* or *quantity of light*. From these *optical* data, conclusions were drawn as to the underwater *energetical* conditions.

Photoelectric cells are usually calibrated according to the intensity of illumination, and this value is read directly in luxes. Intensity of illumination  $E$ , (measured in luxes), however, is by no means proportional to the quantity of radiant energy. This is due to two reasons:

(i) Energy of radiation is a function of wavelength; according to quantum mechanics it is inversely proportional to the latter; (ii) photometrical units, consequently also the unit of illumination [lux] is not strictly physical, but rather physiological: the unit of excitation, caused in the human eye by light. But the sensitivity of human eye is different according to the radiations arriving at different wavelengths, *i. e.* the quotient of this excitation and of the arriving radiant energy differs from wavelength to wavelength.

The so-called "mechanical equivalent of light" gives the connection between energetical and photometrical units, relating to 5550 Å wavelength (wavelength of maximum visibility). This value, reproduced in several textbooks [11, 8] is

$$1 \text{ lux} = 1,290 \cdot 10^{-4} \text{ cal/cm}^2/\text{hr}$$

or

$$1 \text{ cal/cm}^2/\text{hr} = 7750 \text{ luxes.}$$

This connection is valid only for radiations of 5550 Å wavelength; this fact was neglected by some limnologists [10]; others considered the lux value, read on the luxmeter, as directly proportional to the quantity of energy [6, 7]. Some recent limnological textbooks, *e.g.* GESSNER's [3] (though having precisely the sub-title "Energiehaushalt")! or HUTCHINSON's [5] are disregarding this question, other authors are giving — on the basis of the mechanical light equivalent — some average factors to different types and depths of water; energy reaching the surface of water must be multiplied with these factors to estimate the energy reaching the deeper layers of the water; nevertheless, exact conversion is not given, and what is more, it is thought impossible: "It is not possible to give any table by means of which the energy reaching a certain depth can be converted into units of illumination, because the conversion factors will depend upon the quality of the light." [12, p. 775.]

But just such a "table" is required to solve energetical questions. The aim of the author was to calculate this "table", because, in her opinion, this is possible, if the quality of light, the sensitivity of the eye and optical data of the water in question are known.

### Method of calculation

The aim of the calculation is to determine — from optical data of the incident light as well as of the water — the energy (in energetical units) reaching deeper layers of the water.

As it has been already mentioned, the energy of the radiation depends upon its wavelength; according to quantum mechanics, energy  $S$  is inversely proportional to its wavelength

$$S = h \cdot c \cdot \frac{I}{\lambda}$$

It is practical, however, to calculate by means of *relative* values, taking the quantity of energy radiated at  $\lambda = 5550 \text{ \AA}$  as a unit. Relative value of radiated energy thus will be higher or lower than one, if it is radiated at a shorter or longer wavelength than  $5550 \text{ \AA}$ , respectively. This relative quantity of radiant energy is marked  $r_\lambda$  and its values are given in Table 1.

**Table 1**  
*Relative quantities of radiant energy as a function of wavelength*

$\lambda$ [ $\text{\AA}$ ]	$r_\lambda$	$\lambda$ [ $\text{\AA}$ ]	$r_\lambda$
4500	1,233	5800	0,957
4600	1,205	5900	0,940
4700	1,180	6000	0,925
4800	1,156	6100	0,909
4900	1,133	6200	0,895
5000	1,110	6300	0,880
5100	1,088	6400	0,867
5200	1,067	6500	0,856
5300	1,047	6600	0,841
5400	1,028	6700	0,829
5500	1,009	6800	0,816
5550	1,000	6900	0,804
5600	0,991	7000	0,793
5700	0,973		

It has also been mentioned that the sensitivity of the human eye is different to radiations of different wavelengths, *i. e.* the quotient of the light quantity perceived by the eye and of the incident radiant energy changes from

wavelength to wavelength. This light quantity/energy quotient — according to characteristics of the average human eye, fixed by an international convention — has a maximum value at wavelength 5550 Å, and decreases rapidly in both directions. Thus the same quantity of luxes means less ergs (or calories) at the wavelength of 5550 Å, than at either shorter or longer wavelengths. This light quantity/energy quotient, the so-called "value of relative visibility"  $V_\lambda$  is given by the mentioned convention of the International Photometric Commission in such a way that  $V_\lambda$  represents the unit at wavelength  $\lambda = 5550 \text{ \AA}$ , and decreases sharply in both directions. Values of  $V_\lambda$  are given in Table 2 as functions of  $\lambda$ .

**Table 2**  
*Relative visibility as a function of wavelength*

$\lambda$ [Å]	$V_\lambda$	$\lambda$ [Å]	$V_\lambda$
4500	0,038	5800	0,870
4600	0,060	5900	0,757
4700	0,091	6000	0,631
4800	0,139	6100	0,503
4900	0,208	6200	0,381
5000	0,323	6300	0,265
5100	0,503	6400	0,175
5200	0,710	6500	0,107
5300	0,862	6600	0,061
5400	0,954	6700	0,032
5500	0,995	6800	0,017
5550	1,000	6900	0,008
5600	0,995	7000	0,004
5700	0,952		

If the luxmeter is fitted with an ideally monochromatic colour filter (with no extinction in its center and total extinction of the other wavelengths) the value read, divided by the product  $r_\lambda \cdot V_\lambda$ , will be strictly proportional to the quantity of radiant energy.

Nevertheless, further calculations are required if the absolute value of the radiant energy, passing under the surface of the water is to be calculated. If the conversion factor between units of radiant energy and photometric units is known for one single wavelength, it is calculable to all other wavelengths too. But this conversion factor is known: this is the so-called "mechanical equi-

valent of light", just mentioned, with the value of

$$1 \text{ lux} = 1,290.10^{-4} \text{ cal/cm}^2/\text{hr}$$

or

$$1 \text{ cal/cm}^2/\text{hr} = 7750,0 \text{ lux } (\lambda = 5550 \text{ \AA})$$

Naturally, by taking dimensions into consideration, this can be converted into any other energetic or photometric units. Some examples are given in Table 3, and Table 4 gives some of the more important conversion factors ( $M$ ) and their reciprocals.

**Table 3**  
*Mechanical equivalents of photometric units*

*The equivalents of intensity of illumination [lux] have a dimension of power/area, e. g.*

cal/cm <sup>2</sup> /hr	
cal/cm <sup>2</sup> /sec	
erg/cm <sup>2</sup> /hr	
erg/cm <sup>2</sup> /sec	
W/cm <sup>2</sup>	etc.

*The equivalents of luminous current [lumen] have a dimension of power e. g.*

cal/hr	
cal/sec	
erg/hr	
erg/sec	
W	etc.

*The equivalents of light quantity [lumen · sec] have a dimension of energy e. g.*

cal	
erg	
Whr	etc.

According to the foresaid considerations,  $S_\lambda$  the radiant energy (of wavelength  $\lambda$ ) is calculable from the lux-value ( $E$ ), read from scale of luxmeter by the equation

$$S_\lambda = E \frac{M}{V_\lambda r_\lambda}$$

and total energy, radiated in visible light, by equation

$$S = M \cdot E \int_{\lambda=4500 \text{ \AA}}^{\lambda=7000 \text{ \AA}} \frac{1}{V_r} d\lambda$$

In practice there is no possibility of numerical integration; at the same time this integration is superfluous, for  $S_\lambda$  and  $S$  are calculated from luxmeter-readings with and without colour filter, respectively.

Table 4

*Conversion factors between energetical and photometrical units at 5550 Å wavelength*

1 lm	1,501 $10^{-3}$ W
1 lm	1,290 $10^{-7}$ kcal/h
1 lm	1,290 $10^{-4}$ cal/h
1 lm	3,583 $10^{-1}$ cal/sec
1 lm	1,501 $10^{-4}$ erg/sec
1 lm	2,040 $10^{-6}$ HP
1 lx	1,501 $10^{-3}$ W/cm <sup>2</sup>
1 lx	1,290 $10^{-7}$ kcal/cm <sup>2</sup> /h
1 lx	1,501 $10^{-4}$ erg/cm <sup>2</sup> /sec
1 lx	2,040 $10^{-6}$ HP/cm <sup>2</sup>
1 W	6,662 $10^2$ lm
1 cal/h	7,752 $10^3$ lm
1 kcal/h	7,752 $10^6$ lm
1 cal/sec	2,791 lm
1 erg/sec	6,662 $10^{-5}$ lm
1 HP	4,902 $10^6$ lm
1 W/cm <sup>2</sup>	6,662 $10^2$ lx
1 kcal/cm <sup>2</sup> /h	7,752 $10^{-6}$ lx
1 erg/cm <sup>2</sup> /sec	6,662 $10^{-5}$ lx
1 HP/cm <sup>2</sup>	4,902 $10^6$ lx

Table 5 gives values of  $S_\lambda$  in two units, as a function of wavelength. By multiplying luxmeter-readings with  $S_\lambda$  values given in Table 5, the energy (in energetical units) is obtained.

The suitability of this calculation method is illustrated by the following example. The basic points of departure are some raw data of illumination-intensity as measured in summer 1955 at Lake Nagyszéktó (County Csongrád, South Hungary). The optical characteristics of the water of the lake were also determined [2].

The task is to calculate — for certain spectral sections — the energetical conditions of Lake Nagyszéktó in 20 cm and 40 cm deep layers.

**Table 5**

*The radiant energy of monochromatic light corresponding to 1 lux in two energetical units as a function of wavelength*

Å	erg/cm <sup>2</sup> /sec	cal/cm <sup>2</sup> /sec
4500	$3,194 \cdot 10^5$	$7,623 \cdot 10^{-7}$
4600	2,085	4,976
4700	1,403	3,349
4800	0,938	3,349
4900	0,636	1,518
5000	0,423	1,009
5100	0,274	0,655
5200	0,198	0,473
5300	0,166	0,397
5400	0,153	0,365
5500	0,149	0,367
5550	0,150	0,358
5600	0,152	0,363
5700	0,172	0,386
5800	0,180	0,430
5900	0,211	0,503
6000	0,257	0,614
6100	0,328	0,780
6200	0,402	1,051
6300	0,644	1,538
6400	0,988	2,357
6500	1,631	3,895
6600	2,943	7,025
6700	5,559	13,27
6800	10,72	25,59
6900	25,02	59,72
7000	50,03	119,4

*Starting data.* (1) Intensity of illumination on the surface of the water at

6 a. m.	1100 luxes
8 a. m.	6000 luxes
8 a. m.	700 luxes

## (2) Extinction coefficients of 1 cm thick layer of water:

Wavelength (spectral section)	Extinction coefficient/cm
4500 (blue)	0,096
4900 (greenish blue)	0,057
5300 (bluish green)	0,048
5700 (green)	0,034
6100 (yellow)	0,018
6500 (orange)	0,012
6900 (red)	0,009

Steps of calculation:

a) Total illumination reaching the surface of the water is known, its spectral distribution being unknown. In the course of measurements this could have been determined too, by using a colour filter series with well-determined spectral extinctions. At the time of measurements these filters were not available, so this missing datum had to be determined by calculation.

Calculation can be carried out with strict accuracy, by presuming the Sun's radiation as that of a black body with a surface radiation temperature of  $t = 6000^\circ \text{C}$ . By applying PLANCK's radiation law to it, the spectral distribution of energy is obtained. According to PLANCK's law

$$E_\lambda = 2\pi c_1 \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \frac{\lambda^{-5}}{e^{\frac{c_2}{\lambda T}} - 1} d\lambda = \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} f(\lambda, T) d\lambda$$

where  $E$  means the energy of blackbody radiation, radiating at  $T$  absolute temperature and  $d\lambda$  interval without polarization to all directions of space [ $\text{erg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ ]

$c_1$  is a constant, the shorthand notation of  $2\pi hc$ , with a value of  $3,697 \cdot 10^{-5}$  [ $\text{erg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$ ]

$c_2$  is another constant, the shorthand notation of  $\frac{ch}{k}$  with a value of  $1,432$  [ $\text{cm} \cdot \text{degrees}$ ] (BOLTZMANN's constant).

$T$  is taken as a constant; it equals in this case  $\sim 6273 \text{ K}^\circ$ , according to the surface temperature of the Sun.

Then the upper equation is integrated between the limits of different spectral sections, e. g. to the blue section between  $4300-4700 \text{ \AA}$ , to the greenish-blue section between  $4700-5100 \text{ \AA}$ , etc.

This function is poorly integrable, but by determining the partial integral equation between the limits just mentioned, giving the  $B$  fraction of total energy falling within the section, this difficulty is eliminated. This function,

$$B = f(\lambda, T)$$

is well-integrable. Results of integration are given in several tables [e. g. 11]. (Data are strictly correct if radiation passes to a space with a temperature of absolute zero, but this restriction is practically negligible.) By carrying out this integration to seven sections of the visible spectrum, the following percentages of distribution are obtained:

blue .....	0,26
greenish blue .....	0,91
bluish green .....	11,1
green .....	40,8
yellow .....	36,3
orange .....	9,9
red .....	0,7 [4]

Thus illumination [lux] of the unit area of Lake Nagyszéktó was distributed in the following way to the seven spectral sections (Table 6):

Table 6

*Illumination [lux] of the unit area of surface of Lake Nagyszéktó*

Spectral section	6 a.m.	8 a.m.	8 p.m.
blue .....	2,86	11,6	1,83
greenish blue .....	10,4	54,4	6,47
bluish green .....	122,1	668,0	77,7
green .....	449,8	2452,0	285,6
yellow .....	398,6	2174,0	254,2
orange .....	108,9	596,0	69,3
red .....	7,7	44,0	4,9
total visible light ....	1100,0	6000,0	700,0

b) Values of illumination reaching 20 and 40 cm deep layers of Lake Nagyszéktó water are given as follows [luxes]. Data were calculated by knowing layer deepness ( $l$ ) and extinction coefficient ( $\beta$ ), by solving equation

$$I = I_0 \frac{1}{\text{num} \log \beta \cdot l}$$

either numerically or graphically (Table 7).

Table 7

*Values of illumination reaching 20 and 40 cm deep layers of Lake Nagyszéktó*

Spectral section	6 a.m.		8 a.m.		8 p.m.	
	20 cm	40 cm	20 cm	40 cm	20 cm	40 cm
blue .....	0,03	0,00	0,12	0,00	0,02	0,00
greenish blue .....	0,83	0,04	4,53	0,19	0,53	0,02
bluish green .....	23,20	3,17	126,4	17,31	14,76	2,02
green .....	184,01	28,27	1003,68	154,22	117,10	17,19
yellow .....	246,88	34,25	1346,64	186,79	157,54	21,85
orange .....	93,65	53,36	510,84	291,06	59,60	33,96
red .....	7,23	6,54	39,48	35,70	4,61	4,16
total visible light .....	555,83	125,63	3031,83	685,27	353,86	80,00

c) The intensities of illumination, as calculated to 20 and 40 cm deep layers of the lake, can now be converted to energetical units by multiplying the above calculated values with the appropriate factors of Table 5. Results of conversion are given on Tables 8 and 9.

Table 8

*Radiant energy reaching 20 and 40 cm deep layers of the Lake Nagyszéktó [erg/cm<sup>2</sup>/sec.10<sup>7</sup>]*

Spectral section	6 a.m.		8 a.m.		8 p.m.	
	20 cm	40 cm	20 cm	40 cm	20 cm	40 cm
blue .....	0,001	0,000	0,004	0,000	0,001	0,000
greenish blue .....	0,005	0,000	0,029	0,001	0,003	0,000
bluish green .....	0,038	0,005	0,210	0,028	0,024	0,003
green .....	0,298	0,046	1,626	0,250	0,190	0,029
yellow .....	0,810	0,113	4,422	0,613	0,517	0,071
orange .....	1,527	0,870	8,331	4,747	0,972	0,553
red .....	1,809	1,636	9,878	8,932	1,153	1,041
total energy of visible light	4,488	2,669	24,500	14,571	2,860	1,697

Table 9

Radiant energy reaching 20 and 40 cm deep layers of the Lake Nagyszéktó [cal/cm<sup>2</sup>/sec.10<sup>-5</sup>]

Spectral section	6 a.m.		8 a.m.		8 p.m.	
	20 cm	40 cm	20 cm	40 cm	20 cm	40 cm
blue .....	0,002	0,000	0,009	0,000	0,002	0,000
greenish blue .....	0,012	0,001	0,069	0,003	0,008	0,000
bluish green .....	0,092	0,012	0,502	0,069	0,058	0,008
green .....	0,712	0,109	3,882	0,596	0,453	0,069
yellow .....	1,936	0,269	10,558	1,464	1,235	0,171
orange .....	3,648	2,078	19,897	11,337	2,321	1,323
red .....	4,318	3,906	23,577	21,320	2,753	2,484
total energy of visible light	10,720	6,375	58,494	34,789	6,830	4,055

These data are — naturally — easily converted into other energetical values too.

\* \* \*

The detailed evaluation of the data is not among the aims of this paper, only the elaboration of a method which can solve the principal problem of biological production in natural waters — the calculation of energy passing under the surface of the waters. But a very interesting feature is the relative spectral distribution of energy carried by radiation below the surface of water. It is manifest that (especially in deeper layers of Hungarian natural sodic waters) practically only the red and orange sections of the spectrum are acting as carriers of energy. This phenomenon is most marked if the spectral distribution of the Sun's radiation is compared with the spectral distribution of underwater illumination. The *illumination* carried by joint red and orange sections is 10,6 per cent in the Sun's radiation, already 48 per cent in the 40 cm deep layer of Lake Nagyszéktó water, and *energy* carried by them is not less than 79 per cent of total underwater radiating energy. This predomination of red and orange becomes even more expressed in greater depths.

Attention was already called to this feature of sodic waters by a former paper of the author [1], though the method of calculating underwater energy distribution was not worked out. By the method just described, this statement is supported more exactly.

\* \* \*

The well-known reaction equation of photosynthesis describes in the following way the fixation of energy:



On the right side of equation a compound richer in energy is seen. The energy fixed by this compound is very difficult to measure, directly or indirectly, so the energy household of natural waters was approached by MAUCHA [9] and his followers by measuring the equivalent quantity of oxygen produced. These research works were all characterized by the fact, that the process of photosynthesis was considered from the side of products, *i. e.* from the right side of the equation. It seems to be useful to investigate photosynthesis from another angle, the left side of the equation. But this can be done only by an exact method of measurement of energy penetrating into the water.

The work described in this paper is the first step to continue the researches of MAUCHA: the energetical evaluation of production biology from another point of view.

#### LITERATURE

1. DVIHALLY, S. T. (1959) La transformation de l'énergie dans les eaux intérieures, examinée à la base des recherches effectuées avec des méthodes physico-chimiques modernes. Paper presented at the XIVth Congress of the International Association of Theoretical and Applied Limnology, Vienna, August 21, 1959.
2. DVIHALLY, S. T. (1959) Szikes vizek kémiai, optikai és energetikai vizsgálata produkción-biológiai szempontból. Chemical, optical and energetical investigation of sodic waters from the point of view of production-biology. Dissertation, Budapest. (In Hungarian only.)
3. GESSNER, F. (1955) Hydrobotanik I. Berlin, VEB Verlag der Wissenschaften.
4. HRUSKA, R. (1956) Általános színtan és színmérés. Theory of colours and colour measurement. Budapest, Közgazdasági és Jogi Könyvkiadó. (In Hungarian).
5. HUTCHINSON, G. E. (1957) A Treatise on Limnology I. Geography, Physics and Chemistry, New York, London.
6. JOHNSON, N. G., KULLENBERG, B. (1946) On radiant energy measurements in the sea. *Svenska Hydrografi*, 1, 1—27.
7. JUDAY, C., SCHOMER, G. (1935) The utilization of solar radiation by algae at different depths in lakes. *Biol. Bull.*, 49, 75—81.
8. LANDOLT, BÖRNSTEIN (1952) Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik, Technik, 3, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
9. MAUCHA, R. (1955) A fotoszintézis jelentősége a vizek potenciális termelésének meghatározásakor. The role of photosynthesis in determining the potential production of waters. *MTA Biol. Orv. Oszt. Közl.*, 6, 375—412. (In Hungarian only.)
10. SAUBERER, F., RUTTNER, F. (1941) Die Strahlungsverhältnisse der Binnengewässer. Leipzig, Akad. Verlagsges.
11. Smithsonian Physical Tables. Washington, (1933).
12. SVERDRUP, H. Ü., JOHNSON, M. W., FLEMING, R. H. (1946) The oceans, their physics, chemistry and general biology. New York.

#### BERECHNUNG DER STRAHLUNGSENERGIEVERTEILUNG IM WASSER, ALS PRODUKTIONSBIOLOGISCHES PROBLEM

Das Ziel des vorliegenden Artikels besteht darin, eine Methodik zur Lösung eines der grundlegenden Probleme der biologischen Produktion in natürlichen Gewässern — zur genauen Berechnung der unter die Wasseroberfläche eindringenden Lichtenergie — zu bieten.

Bis heute blieb die Messung der unter die Oberfläche von natürlichen Gewässern eindringenden Strahlungsenergie ein ungelöstes Problem, da bei dem gegenwärtigen Stand der Technik die Energiemessapparate für Unterwassermessungen nicht geeignet sind. Zu solchen Messungen werden in der Regel lichtelektrische Beleuchtungsmesser, in erster Reihe Selenfotolelemente mit Sperrschiicht verwendet, und aus der auf Wirkung der Beleuchtung erhalte-

nen Spannung schließt man auf die an der Meßstelle herrschenden Energiemenge. In Anbetracht dessen, jedoch, daß die Beleuchtungsstärke der Strahlungsenergiemenge nicht proportional ist, muß der am Luxmeter abgelesene Wert mit der Reziproke des Produktes von der relativen Sichtbarkeit und der relativen Strahlungsenergiemenge korrigiert werden, damit der auf diese Weise erhaltene Wert der Strahlungsenergiemenge proportional sei. In Kenntnis des numerischen Zusammenhangs zwischen den Einheiten der Lichttechnik den Einheiten der Strahlungsenergie auf einer gegebenen Wellenlänge, können wir aus den auf dem Luxmeter abgelesenen Werten auch den absoluten Wert der unter die Wasseroberfläche eindringenden Energiemenge errechnen.

## ВЫЧИСЛЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В ВОДЕ ЛУЧИСТОЙ ЭНЕРГИИ, КАК ПРОБЛЕМА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ

Целью настоящей статьи является разработать методику для разрешения одной из основных проблем биологической продукции естественных водоемов — проблемы точного исчисления количества попадающей под поверхность воды световой энергии.

Измерение лучевой энергии, попадающей под поверхность естественных водоемов, остается до наших дней неразрешенной проблемой, так как при нынешнем положении техники приборы, служащие для измерения энергии, неприменимы для проведения измерений под водой. Для подобных измерений применяются, как правило, светоэлектрические люксометры, прежде всего селеновые фотоэлементы с экранирующим слоем и из полученного под действием освещения напряжения можно делать заключения относительно количества энергии, имеющейся на месте измерения. Однако, ввиду того, что степень освещенности не идентична с количеством лучевой энергии, необходимо отсчитанные на люксметре данные откорректировать на обратное произведение относительной видимости и относительного количества лучевой энергии, чтобы полученная таким образом величина была пропорциональна количеству лучевой энергии. Зная числовую связь между единицами энергии излучения и единицами световой техники относительно данной длины волн, из отсчитанных на люксметре данных можно исчислять абсолютную величину количества энергии попадающего под поверхность воды.

ZSUZSA T. DVIGHALLY, Budapest VIII., Puskin u. 3., Hungary.



# ÜBER DIE ANTIDIURETISCHE WIRKUNG DES ORGANON SUBCOMMISSURALE

M. PALKOVITS und I. P. FÖLDVÁRI

ANATOMISCHES INSTITUT, MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT, BUDAPEST (VORSTAND: F. KISS)  
UND PATHOLOGISCH-PHYSIOLOGISCHE ABTEILUNG (LEITER: P. KERTAI)  
DES STAATLICHEN HYGIENE-INSTITUTS, BUDAPEST (GENERALDIREKTOR: T. BAKÁCS)

(Eingegangen am 25. November 1959)

## Zusammenfassung

Die Technik der Herausnahme des Organon subcommissurale an Ratten wird beschrieben. Mit dem Organextrakt wurde die ADH-Titrierung vorgenommen, die im wesentlichen darin besteht, daß die Veränderungen der in Intervallen von 10 Minuten entleerten Harnmenge nach intravenöser bzw. subkutaner Verabreichung des Extraktes untersucht werden. Die Versuche wurden an 28 Stück 200—350 g schweren Ratten vorgenommen.

Die Titrierung ergab, daß das Organon subcommissurale eine antidiuretisch wirkende Substanz enthält, von der die 10-Minuten-Diurese um 30—80% herabgesetzt wurde. Dieser Effekt konnte 30—40 Minuten nachgewiesen werden; er gleicht der Wirkung des Neurohypophysenextraktes.

Die Literatur enthält zahlreiche Angaben über die histochemische Analogie zwischen Nucl. supraopticus, Nucl. paraventricularis, Neurohypophysensekret und dem Sekret des Organon subcommissurale. Auf Grund dieser Ähnlichkeit und der Titrierungsresultate wird angenommen, daß das Organon subcommissurale und die »klassischen« ADH-Produktionsgebiete ein ähnliches Sekret erzeugen, das über antidiuretische Wirkung verfügt.

## Einleitung

Das Organon subcommissurale ist ein an der Hinterwand der dritten Kammer, am Anfang des Aquaeductus Sylvii befindliches, aus Ependymzellen bestehendes Organ, das im Verlauf der Phylogenetese sehr frühzeitig erscheint und auch am Menschen angetroffen werden kann. Zuerst wurde das Organ von STIEDA [46] 1870 beschrieben, später beschäftigten sich damit sehr eingehend STUDNIČKA [47, 48], SARGENT [43, 44], DENDY [10, 11, 12] und NICHOLLS [33]. Die Bezeichnung Organon subcommissurale gab dem Organ DENDY und NICHOLLS [13] im Jahre 1910. Die erste Monographie, die einen Hinweis auf die Sekretionsfunktion des Organs enthält, stammt von BAUER-JOKL [7]. Die über dem Organ gelegene Gliazellsubstanz wurde zuerst von KRABBE [26, 27, 28] beschrieben, der sie Hypendym nannte. Die bis 1942 erzielten Ergebnisse sind von LEGAIT [29] zusammengefaßt worden.

Die Anwesenheit des Organs am Menschen wurde von zahlreichen Autoren untersucht [7, 9, 13, 14, 22, 24, 27, 29, 36, 39, 53].

Im Zusammenhang mit der Funktion des Organs sind sehr viele Hypothesen aufgestellt worden. DENDY [10] setzte 1902 eine mit dem Liquorkreislauf zusammenhängende Funktion voraus, laut MARBURG [30, 31] und ADAM

[2] sezerniert das Organ Liquor. Nach DENDY [12], DENDY und NICHOLLS [13] sowie NICHOLLS [33] spielt das Organ in der Regulation der Körperhaltung eine Rolle. SARGENT [43, 44] hält es für den Reflexbahnhabschnitt des Opticus, während LEGAIT [29] und OKSCHE [36] eine Photorezeptorfunktion an Fröschen beschrieben haben. BERBLINGER [8] und ISCHIKAWA [19] nehmen eine der Tätigkeit des Corpus pineale analoge Funktion an. Laut OKSCHE [36] sei zwischen dem Organ und dem Corpus pineale eine Neurosekretionsbeziehung vorauszusetzen, wie sie im Hypothalamo-Hypophysensystem vorliegt.

Im Jahre 1917 hat BAUER-JOKL [7] Sekretionstätigkeit im Organon subcommissurale beschrieben, die auch von KOLMER [23, 24, 25] sowie PUUSEPP und VOSS [41] bestätigt wurde. LEGAIT [29] nennt das Sekret Kolloid, das nach REICHOLD [42] aus Eiweiß besteht und in die Kammer gelangt. PESONEN und SETÄLÄ [40] haben am apikalen Teil der Zellen granulierte Tropfen beschrieben. Einen sehr wesentlichen Fortschritt bedeutete es, daß STUTINSKY [49] mit GÖMÖRISCHER Chrom-Hämatoxylin-Flohsinfärbung an Fröschen deutlich gefärbtes Sekret nachzuweisen vermochte. GÖMÖRI-positive Granula wurden von MAZZI [32] bei niederen Tieren und Fischen, von WISLOCKI und LEDUC [51] an Ratten, Hamstern, Mäusen und Meerschweinchen, von BARGMANN und SCHIEBLER [5] bei Hunden und Katzen, von ADAM [1, 2] und OKSCHE [34, 35] bei Cyclostomata und Amphibien, von BARRY [6] bei Säugern, von OKSCHE [36] sowie WISLOCKI und ROTH [53] an menschlichen Embryonen nachgewiesen. Ihr Erscheinen im Verlauf der Ontogenese wurde von WINGSTRAND [50], GRIGNON und GRIGNON [18] untersucht.

Die Autoren sind der Meinung, das Organon subcommissurale über aktive Sekretionstätigkeit aus, und das Sekret sei ein hochmolekularer Polysaccharid-Proteinkomplex, der mit dem Sekret des Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis, mit den Herringschen Körpern und dem in der Neurohypophyse angesammelten Sekret Analogie aufweist [5, 37, 51]. Da die ADH-Aktivität obiger Sekrete nachgewiesen ist, hielt man es für angezeigt, die Rolle des Organon subcommissurale im Wasserhaushalt des Organismus zu untersuchen. WINGSTRAND [50] vermochte keine Beziehungen festzustellen. GILBERT [15] fand bei Elektrokoagulationsuntersuchungen sowie nach Verabreichung des Organextraktes [16] einen Zusammenhang zwischen dem Organ und dem Wasserhaushalt des Organismus, der durch die Veränderung der SCHIFF-Reaktion bei dehydratierten Tieren bewiesen wird [17].

### Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an 28 Stück 200—350 g schweren Albinorattenmännchen vorgenommen. An 4 Tieren arbeiteten wir die Isolierungstechnik des Organon subcommissurale aus, und 24 Tiere wurden für Tritierungszwecke benutzt. Die Ratte eignet sich sehr gut für derartige Untersuchungen, weil sie, über ein gut isolierbares, ausgeprägtes Organon subcommissurale verfügt (Abb. 1), das auch makroskopisch leicht herausgenommen werden kann.

Angaben über die Herausnahme des Organs haben wir nur in den Arbeiten von WINGSTRAND [50] und GILBERT [15, 16] gefunden. WINGSTRAND entnahm dem unter dem Corpus

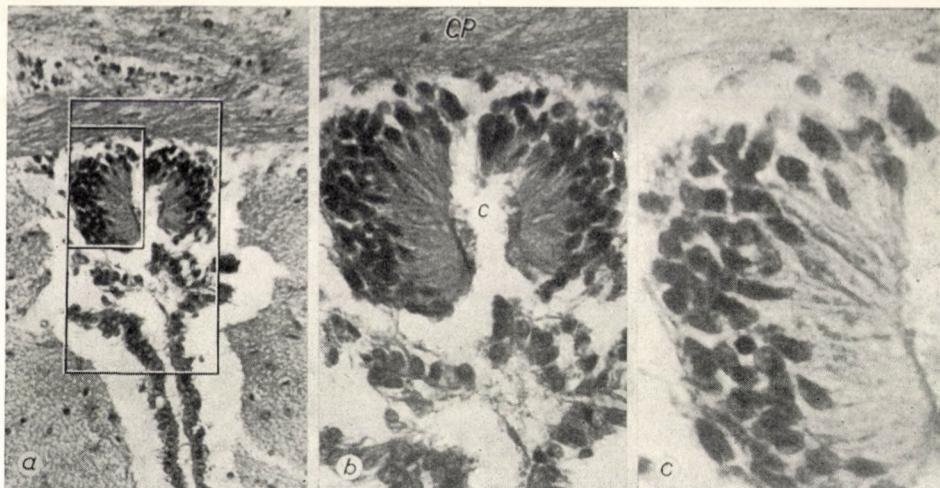


Abb. 1. Frontalschnitt des Organon subcommissurale der Ratte. Bouinsche Fixierung. Chrom-Hämatoxylin-Flochinfärbung nach GÖMÖRI. Vergrößerung: a — 200×, b — 410×, c — 850×.  
CP — Commissura posterior

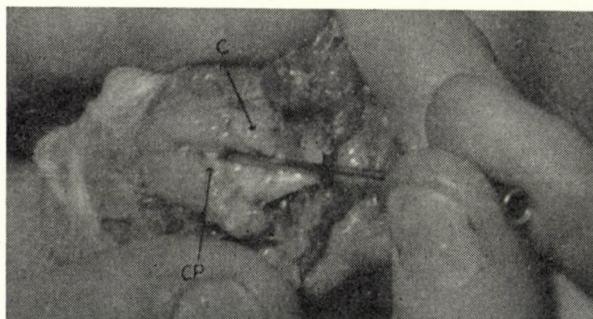


Abb. 2. Herausnahme des Organon subcommissurale bei der Ratte. C — Cerebellum, CP — Commissura posterior

pineale des Hühnerembryos befindlichen Gehirnbereich, der unseres Erachtens auch sehr viel anderes Gehirngewebe enthält, ein  $2 \times 2$  mm großes Stück, während GILBERT die Technik der Herausnahme des Organs nicht erwähnt.

Bei unseren Untersuchungen dekapierten wir die Ratte, entfernten das knöcherne Schädeldach von hinten mit der Schere, drangen in die IV. Kammer ein und schnitten das Kleinhirn in zwei Teile, wodurch die Fossa rhomboidea und der Aquaeductus Sylvii am kaudalen Ende erschlossen wurden. Wir setzten die Scherenspitze in den Aquaeductus und schnitten die Lamina quadrigemina vorsichtig so durch, daß die Commissura posterior — die sich bei Ratten als ein sehr deutlich sichtbares weißes Bündel spannt — nicht lädiert werde. Hiernach legten wir eine Injektionsnadel Nr. 2 (mit 0,5 mm Lumen) so in den erschlossenen Aquaeductus, daß ihre Spitze die Höhle der III. Kammer unter der Commissura posterior gerade erreiche (Abb. 2). Wird die Nadel in dieser Lage herausgehoben, so zerreißt die Commissura posterior, und das in der Nadelvertiefung zurückbleibende, etwa 0,5—0,8 mm lange Gehirngewebe enthält das Organon subcommissurale. Hiervon überzeugten wir uns, indem wir sowohl das herausgenommene Gehirnstückchen als auch das zurückgebliebene Rattengehirn histologisch in

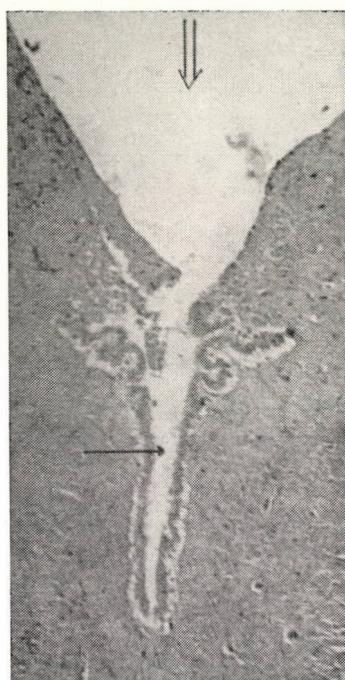


Abb. 3. Kaudaler Abschnitt der III. Kammer. Frontalschnitt in Höhe des Anfangs des Aquaeductus Sylvii. Hämatoxylin-Erythrosin-Färbung. Vergrößerung 120×. Der dünne Pfeil bezeichnet die Kammerhöhle, der dicke Pfeil die Stelle des keilförmigen Ausschnitts

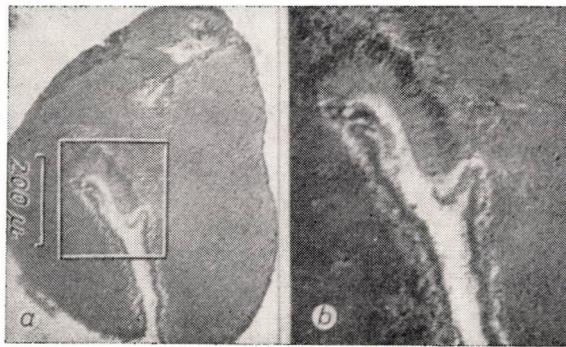


Abb. 4. Organon subcommissurale im Zentrum des isolierten Gehirnabschnitts. Größe des herausgenommenen Gehirnstückchens:  $550 \mu \times 800 \mu$ . Hämatoxylin-Erythrosin-Färbung. Vergrößerung: a — 60×, b — 150×

$8\mu$  dicken Serienschnitten aufarbeiteten. In Abb. 3 sehen wir den hinteren Teil der III. Kammer, wo der keilförmige Ausschnitt die Stelle zeigt, an der die Nadel eingedrungen ist, während Abb. 4 das isolierte Gehirnstückchen wiedergibt, in dessen Zentrum sich das Organon subcommisurale befindet.

Die ADH-Titrierung wurde nach der von HOLEČEK, POLÁK, BLAHA und JIRAŠEK [zit. 20] durchgeführten Modifikation der von JEFFERS, LIVESEY und AUSTIN [21] ausgearbeiteten Methode vorgenommen. Die Tiere erhielten Standarddiät, und am Tage vor dem Versuch ließen wir sie hungrig, ohne die Wasseraufnahme einzuschränken. Sie wurden mit einer 3% des Körpergewichts entsprechenden durch die Magensonde eingeführten Menge 12%igen Alkohols betäubt, was wir nach 20 Minuten wiederholten. Den auf diese Weise narkotisierten Tieren verabreichten wir dreimal — in Intervallen von 10 Minuten — eine 1% des Körpergewichts entsprechende Wassermenge, während unterdessen eine Kanüle in die Blase eingebunden und in einer Bürette von 0,1 ml die in 10 Minuten ausgeschiedene Harnmenge aufgefangen und eine dieser entsprechende Wassermenge während des Versuchs durch die Magensonde ständig ersetzt wurde. Die Tiere befanden sich auf diese Weise im maximal hydratisierten Zustand, und nach etwa 40—50 Minuten war die je 10 Minuten entleerte Harnmenge konstant geworden. Die Titrierung kann vorgenommen werden, wenn bei der dreimal nacheinander bestimmten 10-Minuten-Diurese keine größere Schwankung als 0,15—0,20 ml in Erscheinung tritt. Hiernach kann die zu titrierende Substanz in die herauspräparierte Vena femoralis oder subkutan eingespritzt werden.

Bei diesen Untersuchungen verwendeten wir 12 Ratten zur Titrierung und 12 Tiere zur Gewinnung des Organon subcommisurale-Extraktes. Bei 3 der titrierten Tiere war die Schwankung der 10-Minuten-Diurese mehr als 0,20 ml, so daß sie zur Titrierung nicht geeignet waren. Mit dem auf die beschriebene Weise entnommenen Organextrakt führten wir 10 Titrierungen durch, wobei wir als Kontrolle den aus einem ebenso großen Cortex- oder Mesenzephalonstück hergestellten Extrakt benutzten. In 2 Fällen wurde der dem Organon subcommisurale entnommene Extrakt mit Neurohypophyse statt mit der Kontrolle verglichen. Das herausgenommene Organ wurde in 2 ml physiologischer NaCl-Lösung zerrieben und in verschiedenen Verdünnungen untersucht. Den Kontrollextrakt verabfolgten wir, nachdem die antidiuretische Wirkung abgeklungen war und die 10-Minuten-Diurese wieder den Standardwert erreicht hatte.

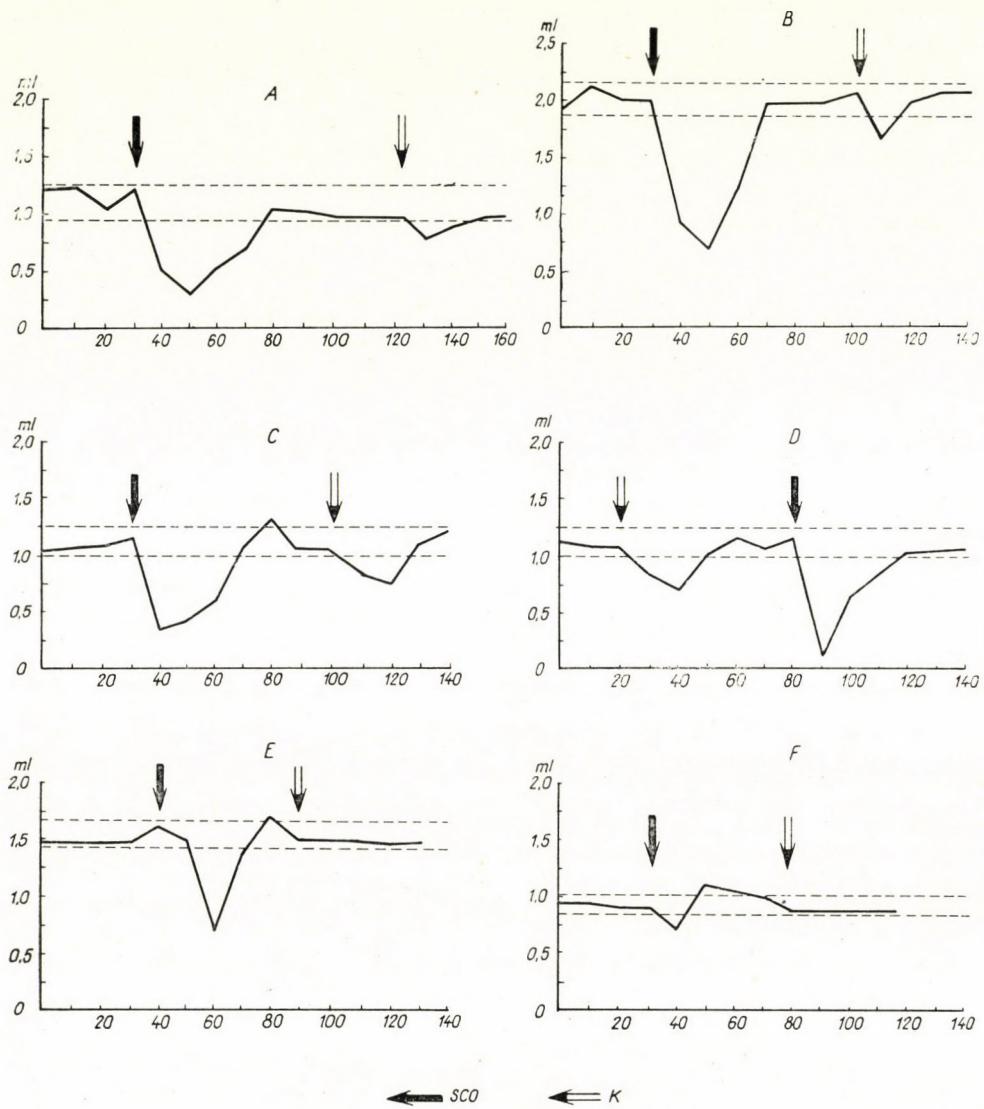
In den Diagrammen, welche die Resultate veranschaulichen, ist an der Ordinate die Menge der 10-Minuten-Diurese in ml, an der Abszisse die Zeit in 10-Minuten-Einheiten angegeben. (Das Gebiet zwischen den beiden gestrichelten Linien entspricht dem Standardwert.)

### Ergebnisse

Das herausgenommene Organon subcommisurale wurde in 2 ml physiologischer NaCl-Lösung zerrieben und unter gleichzeitiger Verabreichung der gleichen Menge Kontrollsubstanz in unterschiedlicher Menge subkutan und intravenös eingespritzt.

Nach der Einführung kam es bei den Tieren bereits in den ersten 10 Minuten zu beträchtlicher Diuresesenke. Der antidiuretische Effekt war in der zweiten 10-Minuten-Periode am stärksten, hielt 30—40 Minuten an und erreichte dann wieder den Standardwert. Je nach der eingeführten Menge sank die Diurese um 30—80%, was im absoluten Wert ausgedrückt bedeutet, daß sich die Diurese von 1,20—2,10 ml/10 Minuten auf 0,15—0,70 ml/10 Minuten verringerte. Diese Wirkung war bei sämtlichen titrierten Tieren zu beobachten (Abb. 5). Nach Einspritzung des Kontrollextraktes trat eine kurze, 10—20 Minuten dauernde, geringe — 0—30%ige — Diuresesenke ein, die auf den kurzen Anurieeffekt des Injektionstraumas zurückgeführt werden darf.

Die Art der Verabreichung war auf den antidiuretischen Effekt ohne Einfluß.



*Abb. 5. Diuresekurven. An der Ordinate die je 10 Minuten entleerte Harnmenge in ml, an der Abszisse die Zeit in 10-Minuten-Einheiten*

*A — 0,5 ml Org. subcomm.-Extrakt intravenös verabreicht. Als Kontrolle dieselbe Menge Cerebrumextrakt intravenös injiziert*

*B — 0,5 ml Org. subcomm.-Extrakt intravenös verabreicht. Als Kontrolle dieselbe Menge Cerebrumextrakt intravenös injiziert*

*C — 0,6 ml Org. subcomm.-Extrakt subkutan verabreicht. Als Kontrolle dieselbe Menge Mesenzephalon-Extrakt subkutan injiziert*

*D — 0,4 ml Org. subcomm.-Extrakt subkutan verabreicht. Als Kontrolle dieselbe Menge Mesenzephalon-Extrakt subkutan injiziert*

*E — 0,25 ml Org. subcomm.-Extrakt intravenös verabreicht. Als Kontrolle dieselbe Menge Cerebrum-Extrakt injiziert*

*F — 0,25 ml Org. subcomm.-Extrakt subkutan verabreicht. Als Kontrolle ebensoviel Cerebrum-Extrakt injiziert*

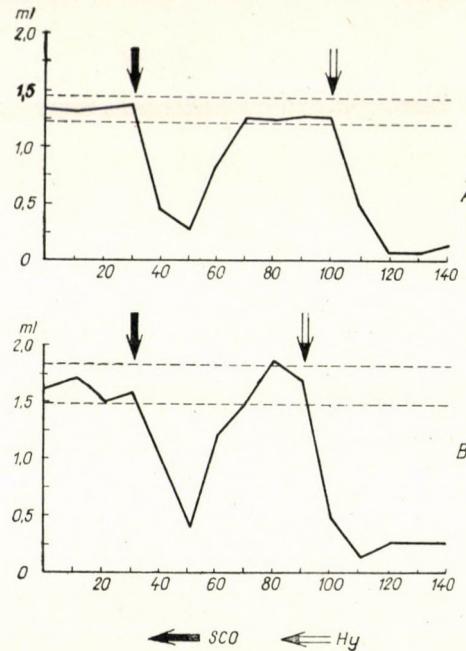
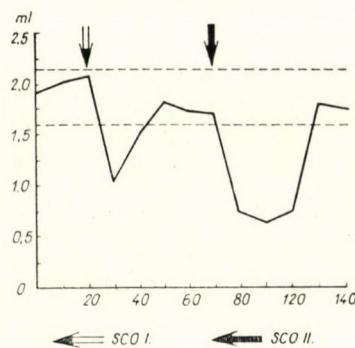


Abb. 6. Diuresekurven. Bezeichnungen s. Abb. 5. SCO — 0,5 ml Org. subcomm.-Extrakt intravenös verabfolgt. Hy — 0,5 ml Neurohypophysenextrakt intravenös verabreicht



Zwei Tieren verabfolgten wir Neurohypophysenextrakt statt der Kontrollsubstanz. Auch in diesen Fällen (Abb. 6) wurde die Diurese von 1,40—1,60 ml/10 Minuten durch den Organon subcommissurale-Extrakt auf 1/5 (0,30—0,45 ml/10 Minuten) herabgesetzt, und die Wirkung hielt 40 Minuten an. Der Neurohypophysenextrakt übte eine ähnliche, aber stärkere antidiuretische Wirkung aus, die länger anhielt, so daß die Diuresemenge den Standardwert auch nach 40 Minuten nicht erreichte.

Am 9. Tier verglichen wir unterschiedlich verdünnte Organon subcommisurale-Extrakte (Abb. 7), wobei die Verdünnung 1 : 3 zu einem antidiuretischen Effekt von gleichem Verhältnis führte.

### Besprechung

Wie in der Einleitung erwähnt wurde, ist die aktive Sekretionstätigkeit des Organon subcommisurale von mehreren Autoren beschrieben und histologisch nachgewiesen worden.

Auf Grund chemischer und histochemicaler Untersuchungen hält man das Sekret für einen hochmolekulären Polysaccharid-Proteinkomplex, in dem der Proteinteil SH- und SS-Gruppen enthält [37, 51]. Bei ihren elektronenmikroskopischen Untersuchungen fanden AFZELIUS und OLSSON [3], der Nucleolus sei sehr ausgeprägt, reich an cystin- und cysteinhaltigen Substanzen und spiele eine sehr wichtige Rolle in der Sekretbildung.

Histochemische Untersuchungen ergaben, daß das Organon subcommisurale aktive Sekretionsfunktion ausübt und das in den Zellen nachgewiesene Sekret hochgradige Ähnlichkeit mit den im Hypothalamo-Hypophysensystem anzutreffenden ADH-haltigen Sekretgranula — den Herringschen Körpern — sowie mit dem in der Neurohypophyse angesammelten Sekret aufweist. Die an beiden Stellen vorkommenden Sekrete lassen sich gut nach GÖMÖRI (Chrom-Hämatoxylin-Flochsin) [5, 51], ebenso mit Aldehyd-Fuchsin [51] färben, während auch die Schiffsche Perjodsäure-Reaktion mit beiden Sekreten positiv ausfällt [5, 51, 52]. Die Bernsteinsäure-Dehydrogenase-Aktivität ist in beiden Sekretionsgebieten von vermindertem Ausmaß [45]. Auch eine geringe Abweichung zwischen den beiden Gebieten läßt sich nachweisen. BARGMANN und SCHIEBLER [5] sowie WISLOCKI und LEDUC [52] fanden, nach Anwendung eines Essigsäureanhydrid oder Essigsäure enthaltenden Fixationsgemisches sei ein Unterschied in der Intensität der Schiff-Reaktion zu beobachten; BARRY [6] stellte bei der Färbung nach GÖMÖRI eine Abweichung nach Salzsäure-Alkoholbehandlung fest, während laut ADAM [1] nach Färbung mit Toluidinblau und Azocarmine eine Differenz in der Intensität zustande kommt. Laut ADAM wird das Organon subcommisurale von Luxol Fast Blue MBS-Kresylviolet elektiv gefärbt. Diese Unterschiede schließen unserer Meinung nach die Möglichkeit nicht aus, daß die Sekrete der beiden Gebiete einen im wesentlichen gleichen Aufbau haben.

Im Verlauf der Ontogenese erscheint das Organon subcommisurale früher als die ADH-produzierenden Gebiete (Nucl. supraopticus, Nucl. paraventralis) [4]. Dies hat auch WINGSTRAND [50] nachgewiesen, der aufzeigte, daß beim Hühnerembryo bereits am 6. Tage Gömöri-positive Granula in den Zellen des Organon subcommisurale erscheinen (dasselbe stellten auch GRIGNON und

GRIGNON [18] fest), während sie in den ADH-erzeugenden Gebieten erst am 9—13. Tage auftreten.

Auf Grund der starken histochemischen Ähnlichkeit schreibt ENAMI [zit. 5] bereits von einem Präoptiko-Subcommissuralsystem.

Da das Sekret der ADH-produzierenden Zonen mit dem in den Zellen des Organon subcommissurale angesammelten Sekret Ähnlichkeit aufweist, ergab sich die Frage, welche Wirkung dieses Sekret auf den Wasserhaushalt des Organismus ausübt. WINGSTRAND [50] nahm das Organon subcommissurale von Hühnerembryonen heraus, zerrieb es in 0,25%iger Essigsäure-Ringer-Lösung, verabreichte es Fröschen und registrierte den Gewichtsverlust der unter Standardbedingungen gehaltenen Tiere. Eine antidiuretische Wirkung vermochte er nicht nachzuweisen. Bei seinem Versuch lagen indessen zahlreiche Fehlerquellen vor, indem er mit einer artfremden Substanz titrierte, die Genauigkeit der experimentellen Methodik nicht im Verhältnis zur Feinheit des Effekts stand, er außerdem eine sehr große Menge anderes Gehirngewebe herausnahm und verabreichte, und schließlich — wie auch von GILBERT [16] erwähnt — die Essigsäure nicht als indifferent für den Organextrakt angesehen werden kann.

GILBERT [15] destruierte in seinem Elektrokoagulationsversuch das Organon subcommissurale und stellte fest, daß die Wasseraufnahme der Tiere hochgradig vermindert war und sie nach 5—10 Tagen zugrunde gingen. Im zweiten Teil seiner Versuche, als er die Wirkung des verabreichten Organextraktes auf die Wasseraufnahme untersuchte, gelangte er zu einem widersprechenden Ergebnis: die Wasseraufnahme der Tiere war auch in diesem Fall herabgesetzt. In GILBERTS Versuch hat die Herausnahme des Organs etwa 45 Minuten in Anspruch genommen, wodurch wahrscheinlich die Aktivität des Extraktes beeinflußt wurde. Außerdem untersuchte er nicht den diuretischen Effekt, sondern die Wasseraufnahme, und schließlich glauben wir, daß es in Fällen, wo es sich um eine 30—50 Minuten dauernde Wirkung handelt, nicht möglich ist, durch tägliche Messung ein bewertbares Resultat zu gewinnen. Der Versuch GILBERTS [17], in dem er die Veränderungen der Schiff-Reaktion an dehydratisierten Tieren untersuchte, beweist die Beziehungen zwischen dem Organon subcommissurale und dem Wasserhaushalt des Organismus, erklärt aber nicht den Wirkungsmechanismus.

Wir waren bestrebt, obige Fehlerquellen bei unserem Versuch auszuschalten. Unser Verfahren der Organherausnahme ermöglicht es, wenig überflüssiges Gehirngewebe zu verabreichen, und die Herausnahme dauert nicht länger als 6 Minuten. Die Titrierung ist sehr empfindlich, und in 10 Minuten läßt sich die Menge der Diurese mit 1/100 ml Genauigkeit verfolgen. Unsere Resultate zeigten in sämtlichen Versuchen eine aktive antidiuretische Wirkung. Der Organextrakt enthält eine Substanz, die imstande ist, die Diurese der Tiere 30—40 Minuten um 30—80% zu senken. Die Substanz wirkt ebenso wie Neuro-

hypophysenextrakt, aber schwächer, was darauf beruhen dürfte, daß es sich bei der Neurohypophyse um einen ADH-Speicherungsort handelt, wo das Sekret in wesentlich größerer Menge vorzufinden ist.

Da die Sekrete der »klassischen« ADH-Erzeugungsgebiete und des Organon subcommissurale histochemische Ähnlichkeit aufweisen und auf Grund unserer Titrierungsergebnisse darf angenommen werden, daß die beiden Gebiete ein sehr ähnlich — vielleicht identisch — wirkendes Hormon produzieren. Diese Hypothese erscheint nicht zu kühn, denn bei Ratten ist das Organon subcommissurale größer als der Bereich des Nucl. supraopticus und Nucl. paraventricularis, im Verlauf der Ontogenese erscheint es sehr bald, ist sehr aktiv und enthält reichlich GÖMÖRI-positives Sekret. Alle diese Tatsachen zeugen für eine aktive Hormonproduktion.

Aus der großen histochemischen Ähnlichkeit und dem ADH-artigen Effekt schließen wir, daß es sich bei dem Nucl. supraopticus, Nucl. paraventricularis und Organon subcommissurale um Gebiete des Zentralnervensystems handelt, welche die gleiche Funktion ausüben.

#### LITERATUR

1. ADAM, H. (1957) Beitrag zur Kenntnis der Hirnventrikel und des Ependyms bei Cyclostomen. *Anat. Anz.*, **103**, 173—188.
2. ADAM, H. (1958) Zur Morphologie der Ventrikelnahen Hirnwandgebiete bei Cyclostomen und Amphibien. *Verh. Deutsch. Zool. Geselsch. in Frankfurt (M.)*. Akad. Verlag, Leipzig, 251—264.
3. AFZELIUS, B. A., OLSSON, R. (1957) The fine structure of the subcommisural cells and of Reissner's fibre in myxine. *Z. Zellforsch.*, **46**, 672—685.
4. ARVY, L., FONTAINE, M., GABE, M. (1955) Modifications histologiques de l'organe sous-commisural au cours du cycle évolutif de *Salmo Salar*. *Arch. Anat. Microsc. et Morph. Exp.*, **44**, 313—322.
5. BARGMANN, W., SCHIEBLER TH. H. (1952) Histologische und cytochemische Untersuchungen am Subcommisural organ von Säugern. *Z. Zellforsch.*, **37**, 582—596.
6. BARRY, J. (1954) Contribution à l'étude de la neurosecretion. *Biol. Med.*, **43**, 327—341.
7. BAUER-JOKL, M. (1917) Über das sogenannte Subcommisuralorgan. *Arb. Neurol. Inst. Wien*, **22**, 41—79.
8. BERBLINGER, W. (1926) Die Glandula pinealis. In HENKE, F. LUBARSCH, O. Handbuch der speziellen path. Anat. und Histol. Springer, Berlin, **8**, 681—759.
9. CLARA, M. (1959) Das Nervensystem des Menschen. J. Ambrosius Barth Verlag, Leipzig, III. Aufl.
10. DENDY, A. (1902) On a pair of ciliated grooves in the brain of the ammocoete, apparently serving to promote the circulation of the fluid in the brain cavity. *Proc. Roy. Soc. London*, **69**, 485—495.
11. DENDY, A. (1907) On the parietal sense organs and associated structures in the New Zealand Lamprey. *Quart. J. Microsc. Sci.*, **51**, 1—29.
12. DENDY, A. (1910) The function of Reissner's fibre and the ependymal groove. *Nature*, **82**, 217.
13. DENDY, A., NICHOLLS, E., G. (1910) On the occurrence of mesocoelic recess in the human brain and its relation to the subcommisural organ of lower vertebrates. *Proc. Roy. Soc. London*, **82**, 515—529.
14. EDINGER, L. (1911) Vorlesungen über den Bau der nervösen Centralorgane des Menschen und der Tiere. Vergl. Anat. des Gehirns, Leipzig, **1**, 321—330.
15. GILBERT, G. J. (1956) The subcommisural organ. *Anat. Rec.*, **126**, 253—265.
16. GILBERT, G. J. (1957) The subcommisural organ: a regulator of thirst. *Am. J. Physiol.*, **191**, 243—247.

17. GILBERT, G. J. (1958) Subcommissural organ secretion in the dehydrated rat. *Anat. Rec.*, **132**, 563—566.
18. GRIGNON, G., GRIGNON, M. (1958) Activité élaboratrice de l'organe souscommissural chez l'embryon de poulet. *Comp. Rend. Ass. Anat.*, **100**, 889—891.
19. ISHIKAWA, E. (1927) Vergleichende Untersuchungen der Zirbeldrüse bei männlichen und weiblichen Tieren. *Arb. Neurol. Inst. Wien*, **29**, 337—347.
20. HÄRSING, L. (1957) Az antidiuretikus aktivitás meghatározása. Die Bestimmung der antidiuretischen Aktivität. In KOVACH, A. A kísérletes orvostudomány vizsgáló módszerei. Untersuchungsmethoden der experimentellen Medizin. Akadémiai Kiadó, Budapest, **3**, 609—620. (Nur ungarisch.)
21. JEFFERS, W. A., LIVEZEY, M. M., AUSTIN, J. H. (1942) A method for demonstrating an antidiuretic action of minute amounts of pitressin: statistical analysis of results. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **50**, 184—188.
22. KEENE, L., HEWER, E. E. The subcommissural organ and the mesocoelic recess in the human brain, together with a note on REISSNER's fibre. *J. Anat.*, **69**, 501—507.
23. KOLMER, W. (1918) Ein rätselhafter Organkomplex der Wirbeltiere. *Zbl. Physiol.*, **33**, 1—8.
24. KOLMER, W. (1921) Das »Sagittalorgan« der Wirbeltiere. *Z. Anat.*, **60**, 652—715.
25. KOLMER, W. (1926) Bau der statischen Organe. In Handbuch der norm. und path. Physiologie, **II**, 789—790. Berlin.
26. KRABBE, K. H. (1925) L'organe sous-commissural du cerveau chez les mammifères. *Kungl. Dansk. Vidensk. Selks. Biol. Medd.*, **5**, 1—83.
27. KRABBE, K. H. (1933) Anatomy of subcommissural organ of brain; review of literature. *Nordisk medicinskt tidskrift*, **6**, 1030—1035.
28. KRABBE, K. H. (1933) L'organe sous-commissural du cerveau. *Presse méd.*, **41**, 1750—1752.
29. LEGAIT, E. (1942) Les organes épendymaires du troisième ventricule. Georges Thomas, Nancy.
30. MARBURG, O. (1908) Normale und pathologische Histologie der Zirbeldrüse. *Arb. Neurol. Inst. Wien*, **17**, 227—228.
31. MARBURG, O. (1920) Neue Studien über die Zirbeldrüse. *Arb. Neurol. Inst. Wien*, **23**, 1—37.
32. MAZZI, V. (1952) Caretteri secretori nelle cellule dell'organo sotto commissurale dei vertebrati inferiori. *Arch. Zool. Ital.*, **37**, 445—464.
33. NICHOLLS, G. E. (1912) The structure and development of REISSNER's fibre and the subcommissural organ. *Quart. J. Micr. Sc.*, **58**, 1—116.
34. OKSCHE, A. (1954) Über die Art und Bedeutung sekretorischer Zelltätigkeit in der Zirbel und im Subcommissuralorgan. *Anat. Anz.*, **101**, 88—96.
35. OKSCHE, A. (1955) Untersuchungen über die Nervenzellen und Nervenverbindungen des Stirnorgans, der Epiphyse und des Subcommissuralorgans bei anuren Amphibien. *Morph. Jahrb.*, **95**, 393—401.
36. OKSCHE, A. (1956) Funktionelle histologische Untersuchungen über die Organe des Zwischenhirndaches der Chordaten. *Anat. Anz.*, **102**, 404—409.
37. OLLSON, R. (1958) Studies on the subcommissural organ. *Acta zool. (Stockholm)*, **39**, 71—102.
38. PESONEN, N. (1941) Über das Subcommissuralorgan beim Meerschweinchen. *Acta Soc. Med. Fenn. (»Duodecim«)*, **22**, 53—78.
39. PESONEN, N. (1941) Über das Subcommissuralorgan beim Menschen. *Acta Soc. Med. Fenn. (»Duodecim«)*, **22**, 79—113.
40. PESONEN, N., SETÄLÄ, K. (1943) Über mit dem Subkommissuralorgan zusammenhängende Zellanhäufung. *Acta Soc. Med. Fenn. (»Duodecim«)*, **23**, 1—13.
41. PUUSEPP, L., VOSS, H. E. V. (1924) Studien über das Subcommissuralorgan. I. Das Subcommissuralorgan beim Menschen. *Fol. Neuropath. Estoniana*, **2**, 13—21.
42. REICHOLD, S. (1942) Untersuchungen über die Morphologie des subfornikalen und des subcommissuralen Organs bei Säugetieren und Sauropsiden. *Z. mikrosk.-anat. Forsch.*, **52**, 455—479.
43. SARGENT, P. E. (1903) The ependymal grooves in the roof of the diencephalon of vertebrates. *Science*, **17**, 487—488.
44. SARGENT, P. E. (1904) The optic reflex apparatus of vertebrates for short circuit transmission of motor reflexes through REISSNER's fiber. *Bull. Mus. Comp. Zool., Harvard*, **45**, 129—258.
45. SHIMIZU, N., MORIKAWA, Y., ISHI, Y. (1957) Histochemical studies of succinic dehydrogenase und cytochrome oxidase of the rabbit brain, with special reference to the results in the paraventricular structures. *J. Comp. Neurol.*, **108**, 1—21.
46. STIEDA, L. (1870) Studien über das centrale Nervensystem der Wirbeltiere. *Z. wiss. Zool.*, **20**, 386—425.

47. STUDNIČKA, F. K. (1900) Untersuchungen über den Bau des Ependyms der nervösen Centralorgane. *Anat. Hefte*, **15**, 301—431.
48. STUDNIČKA, F. K. (1905) Die Parietalorgane. In OPPEL Lehrb. d. vergl. mikrosk. Anat. der Wirbeltiere. **5**, 1—255.
49. STUTINSKY, F. (1950) Colloide, corps de HERRING et substance GOMORI positive de la neurohypophyse. *C. R. Soc. Biol.*, **144**, 1357—1360.
50. WINGSTRAND, K. G. (1953) Neurosecretion and antidiuretic activity in chick embryos with remarks on the subcommissural organ. *Ark. Zool. (Stockholm)*, **6**, 41—67.
51. WISLOCKI, G. B., LEDUC, E. H. (1952) The cytology and histochemistry of subcommissural organ and REISSNER's fiber in rodents. *J. Comp. Neurol.*, **97**, 515—544.
52. WISLOCKI, G. B., LEDUC, E. H. (1954) The cytology of the subcommissural organ, REISSNER's fiber, periventricular glial cells, and posterior collicular recess of the rat's brain. *J. Comp. Neurol.*, **101**, 283—310.
53. WISLOCKI, G. B., ROTH, W. D. (1958) Selective staining of the human subcommissural organ. *Anat. Rec.*, **130**, 125—130.

#### ANTIDIURETIC EFFECT OF THE SUBCOMMISSURAL ORGAN

The technique of the removal of the subcommissural organ is described. ADH-titration with the extract of the organ was performed: essentially, it consisted in intravenous and subcutaneous injections of the extract and the observation of their effect on the amount of urine discharged at intervals of 10 minutes.

Tests by means of titration showed the subcommissural organ to contain an antidiuretic substance which reduced the amount of urine, discharged at 10-minute intervals, by 30 to 80 per cent. Such antidiuretic effect, similar to that of neurohypophyseal extract, lasted from 30 to 40 minutes.

Literature contains many references to the existence of a histochemical analogy between the secretion of the supraoptic nucleus, the paraventricular nucleus, the hypophysis and that of the subcommissural organ. The said similarity and the results of titration lead the authors to the conclusion that the substance secreted by the subcommissural organ is essentially similar to, and has the same antidiuretic effect as, the secretion produced at the "classic" sites of ADH.

#### АНТИДИУРЕТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ORGANON SUBCOMMISSURALE

Авторы дают описание техники удаления *organon subcommissurale* у крыс. Вытяжкой органа проводилось титрование АДГ, сущность которого состоит в исследовании изменения количества выделенной каждые 10 минут мочи под действием внутривенного или подкожного введения вытяжки. Исследования проводились на 28 крысах; средний вес крыс был 200—350 г.

На основании титрования было доказано, что *organon subcommissurale* содержит антидиуретическое вещество, которое снижает количество 10 минутного диуреза на 30—80%, и это действие можно выявить в течение 30—40 мин. Данное действие подобно эффекту нейрогипофизарной вытяжки.

В литературе имеется ряд данных о гистохимической аналогии между выделяемым *nucl. supraopticus*, *nucl. paraventricularis*, *neurohypophysis* и секретом *organon subcommissurale*. На основании упомянутого сходства и результатов титрования авторы предполагают, что *organon subcommissurale* и «классические» области выработки АДГ производят подобных секрет, который имеет антидиуретическое действие.

MIKLÓS PALKOVITS, Budapest, IX., Tűzoltó u. 58., Ungarn.

PÉTER I. FÖLDVÁRY, Budapest, IX., Gyáli út 4., Ungarn.

# UNTERSUCHUNG DER DAUER DER MAGENVERDAUUNG DES ZANDERS (*LUCIOPERCA LUCIOPERCA* L.) MITTELS EINER RÖNTGENOLOGISCHEN METHODE

GY. MOLNÁR und I. TÖLG

INSTITUT FÜR ZOOLOGIE, AGRARWISSENSCHAFTLICHE UNIVERSITÄT, GÖDÖLLŐ (VORSTAND: GY. FÁBIÁN) und BIOLOGISCHES FORSCHUNGSIINSTITUT DER UNGARISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN, TIHANY (VORSTAND: E. WOYNÁROVICH)

(Eingegangen am 30. Januar 1960)

## Zusammenfassung

Die Autoren berichten über eine neue Methode zur Untersuchung der Magenverdauungsdauer des Zanders (*Lucioperca lucioperca* L.). Das röntgenologische Verfahren ermöglicht es, die untersuchten Exemplare bis zur Beendigung des Versuches unversehrt am Leben zu erhalten. Hierdurch kann ihre Verdauung bis zur vollständigen Entleerung des Magens fortgesetzt beobachtet werden. Die Methode ist bloß zur genauen Bestimmung der Dauer der im Magen sich abspielenden Verdauung geeignet, gewährt jedoch keine Möglichkeit zur Beobachtung des in dem Darm sich vollziehenden Verdauungsprozesses.

## Einleitung

Für eine Untersuchung der Magenverdauung des Zanders (*Lucioperca lucioperca* L.) im Laboratorium wurden die Grundlagen durch die im Biologischen Forschungsinstitut der Ungarischen Akademie der Wissenschaften zu Tihany vorgenommenen Untersuchungen der Zandernahrung [2, 5, 6] gelegt. Bei einer Untersuchung des Mageninhaltes läßt sich aus dem Verdauungszustand der Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme nur dann ermitteln, wenn die für die betreffende Wassertemperatur charakteristische Dauer der Magenverdauung bekannt ist. Außerdem ist es auch bei den, mit Zandern durchgeführten magenphysiologischen Untersuchungen notwendig, die Dauer der Magenverdauung von im Aquarium gehaltenen, mit natürlicher Fischnahrung künstlich gefütterten Versuchs-Zandern zu kennen.

## Problemstellung

Zur Erreichung der uns gesteckten obenerwähnten Ziele haben wir zur Beobachtung der Magenverdauung der Zander eine röntgenologische Methode ausgearbeitet. Dabei waren wir bemüht, den Zeitpunkt der Entleerung des Zandermagens in einer solchen Weise genau beobachten zu können, daß dabei der untersuchte Fisch nicht beschädigt werde. In der uns zugänglichen Fachliteratur haben wir eine solche Versuchsmethode nicht erwähnt gefunden. Unser Zweck war es, über die Verdauung der Versuchstiere von der Nahrungsaufnahme bis zur vollständigen Entleerung des Magens jederzeit ein genaues Bild

zu erhalten und dabei die Beobachtung der Tiere bis zu Beendigung des Versuches weiter fortsetzen zu können. Mit Rücksicht darauf konnten wir eine, mittels Sektion vorgenommene Kontrolle als nicht geeignet erachten. Hiebei fällt nämlich das untersuchte Zanderexemplar aus dem restlichen Teil des Versuches aus und können bloß die noch nicht untersuchten Fische bis zur Beendigung der Beobachtungszeit zur Verfügung verbleiben; ferner wird auch zu dieser Methode eine große Anzahl von Versuchstieren benötigt, damit auch noch für die letzten Beobachtungen genügend Exemplare verbleiben.

Bei der an lebenden Fischen anwendbaren Untersuchungsmethode mittels der Magensonde von SEABURG [3] verbleiben zwar die während des Versuches untersuchten Fische am Leben, müssen jedoch aus der weiteren Beobachtung ausgeschlossen werden, da ihr Mageninhalt entfernt wurde. Bei dieser Methode werden die Nachteile des Sektionsverfahrens bloß teilweise beseitigt: die untersuchten Tiere gehen zwar nicht zugrunde, können jedoch zur weiteren Beobachtung ebenfalls nicht herangezogen werden, da ihr Magen entleert ist. DUBETS [1] konstruierte zur Verbesserung der Methode von WHITE [4] ein verlängertes, konisch sich verengerndes Instrument, welches er in den Ösophagus einführt und den Mageninhalt auf diese Weise untersuchte. Dieses Instrument ist jedoch bloß zu einer teilweisen Untersuchung, bloß zur Entnahme einer Mageninhaltsprobe geeignet und kann demnach unserer Zielsetzung nicht genügen.

### Methodik

Der Zander schluckt den seine Nahrung bildenden Fisch unversehrt, zu seiner Gänze hinab. Dies ermöglicht uns eine röntgenologische Untersuchung seines Mageninhaltes vorzuhnehmen. Das Skelett und die Schwimmblase des in den Zandermagen gelangten Nahrungsfischleins gewährt bei der Röntgenaufnahme ein zur Beobachtung recht wohl geeignetes Bild. Der Mageninhalt kann fortgesetzt weiter beobachtet werden, solange, bis die Nahrung vollständig zu Brei zerfalle und aus dem Magen entleert ist. Hierdurch wird auch die Anwendung von Kontrastmitteln bei der Röntgenaufnahme überflüssig, obgleich wir auch in dieser Richtung Versuche (mit Barium) angestellt haben. Die anatomische Lage des Magens fällt glücklicherweise derart, daß weder die Rippen noch die knochigen Unterlagen der Brustflossen das Röntgenbild stören.

Bei der Ausarbeitung unserer Methode verwendeten wir aus dem Balaton gefangene, 25—30 cm große Zander. Die gefangen Versuchstiere wurden in Aquarien mit durchfließendem Balatonwasser gehalten. Gefüttert wurden sie nach einer 2—13 Tage langen Fastenzeit auf künstliche Weise und zwar wurden sie geschoppt. Die als Nahrung gereichten Fischlein wurden vorher nach Länge und Gewicht abgemessen. Wir stopften Jungfische von *Pelecus cultratus*

tus, Abramis brama und geschlechtsreife Alburnus alburnus, deren Skelett bereits verknöchert ist, am geeignetesten.

Die Versuchszander wurden mit an, unter der ersten Rückenflosse durchgesteckten, rostfreien Drahtstücken befestigten, mit Nummern versehenen Zettelchen bezeichnet. Ein Erbrechen der verschlungenen Nahrung kommt ziemlich häufig vor, deshalb ist es unumgänglich notwendig, sowohl die Versuchstiere als auch die verfütterten Nahrungsfische identifizieren zu können. Aus diesem Grunde haben wir außer den beim Versuch verwendeten Zandern auch die verfütterten Nahrungsfische besonders bezeichnet. Zu diesem Zwecke erwies sich eine variierte Verstümmelung der, bis zum zweiten Abschnitt des

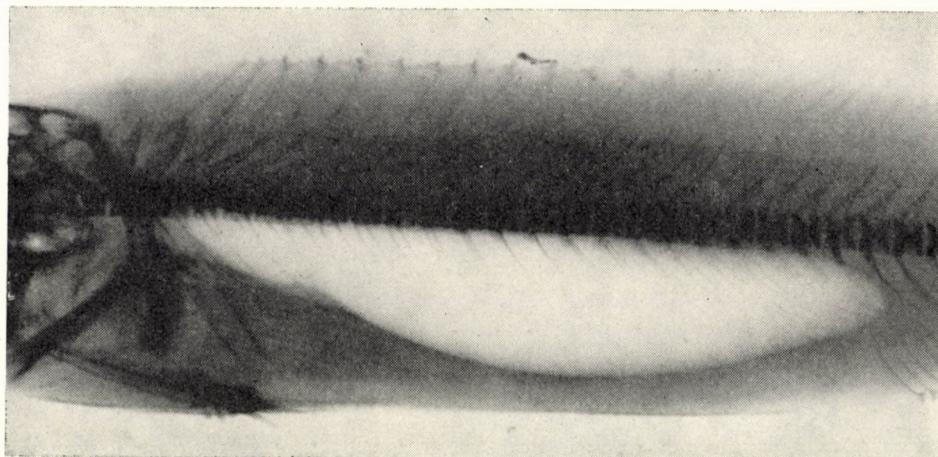


Abb. 1. Röntgenaufnahme eines Zanders mit leerem Magen

Verdauungsprozesses intakt verbleibenden Schwanzflosse am besten geeignet. Durch die Bezeichnung können sowohl die eventuell erbrochenen Nahrungsfische als auch der Versuchszander, dessen Magen entleert wurde, leicht festgestellt und aus dem weiteren Verlauf der Beobachtung ausgeschlossen werden.

Wir haben die Röntgenaufnahmen mit einer Siemens-Kugel (Focus = 70 cm) verfertigt. Die Fische wurden in lebendem Zustande auf die Aufnahmekassette gelegt. Wir haben ausschließlich Seitenaufnahmen gemacht: Aufnahmen mit anderen Lagen hielten wir für überflüssig. Belichtungszeit war, je nach den verschiedenen Körperbreiten der Zander 1—1,25 Sekunden.

Auf dem entwickelten Röntgenfilm gibt bei einem Zander mit leerem Magen der unterhalb der mit Luft gefüllten Schwimmblase erkennbare zusammengezogene Magen als Weichkörper keinen Schatten (Abb. 1). In manchen Fällen sind einzelne Abschnitte der gegen die Anal-Öffnung gelegenen Windungen des Darms sichtbar.

Auf der seitlichen Aufnahme der mit den Nahrungsfischen gefütterten Zander ist unterhalb des Schattens der Schwimmblase an der, dem Zandermaßen entsprechenden Stelle das Bild des unbeschädigten Nahrungsfisches deutlich zu erkennen. Je nach der Größe des verfütterten Nahrungsfisches erscheint der gefüllte Magen länglich nach rückwärts gezogen. Einen schönen Schatten ergibt der Schädel sowie das Rückgrat des Nahrungsfisches, und wir erhalten ein deutlich dunkles Bild von der Schwimmblase (Abb. 2).

Auf Grund der Untersuchung der Röntgenaufnahmen lassen sich im Verlaufe des Verdauungsprozesses gewisse Abschnitte unterscheiden: Das Verschwinden der Schwimmblase des Nahrungsfisches, sodann das Beugen des Rückgrates und endlich das Auseinanderfallen desselben in Stückchen lassen sich recht gut verfolgen (Abb. 3). Mit dem Fortschreiten der Verdauung gestaltet sich der Schatten des Mageninhaltes immer mehr homogen und lässt er sich vom Schatten der umliegenden Weichteile immer weniger unterscheiden. Nach Beendigung der Magenverdauung kann man oft die Windungen der mit der bretartig gewordenen Nahrung angefüllten Därme und besonders den Mastdarm, wenn sich in diesem auch noch Luft befindet, sehr deutlich erkennen (Abb. 4).

Bei gleichzeitig durchgeführter Fütterung zeigt sich das Fortschreiten der Verdauung und die Entleerung des Magens bei den einzelnen Individuen verschieden. Deshalb haben wir das Verdauungsstadium und die Entleerung des Magens im vorhinein zu gewissen Zeitpunkten festgelegt. Bei unserem Verfahren konnten wir zu den verschiedenen Zeitpunkten ein genaues Bild des Fortschreitens der Magenverdauung der Versuchszander sowie der Entleerung ihres Magens gewinnen. Am Ende des Versuches haben wir mittels neuerlich angestellter Aufnahme die Anzahl der Individuen mit entleertem Magen festgestellt. Mit der Entleerung des Magens ist die Untersuchung beendet. Bei der Ausarbeitung unserer Methode haben wir nach der letzten Aufnahme und nach Konstatierung der Entleerung des Magens das Ergebnis auch im Sezierungswege überprüft. Die auf den Röntgenbildern sichtbare Magenentleerung wurde auch durch diese Untersuchung mittels Sezierung bestätigt. Selbst ein 0,5—1,0 cm langes Rückgratstück kann auf dem richtig belichteten und kontrastreich entwickelten Röntgenbild erkannt werden. Zur Untersuchung der Verdauungsdauer im Darmtrakt des Zanders ist unsere Methode in dieser Form nicht geeignet.

Wir untersuchten die Dauer der Magenverdauung mittels des röntgenologischen Verfahrens zu verschiedenen Temperaturgraden. Im Laufe unserer diesbezüglichen Experimente fanden wir beträchtliche Unterschiede bezüglich der Magenverdauungsdauer zu den verschiedenen Temperaturgraden. Unsere Methode ist geeignet, die Abweichungen bei den verschiedenen Temperaturgraden nachzuweisen zu können. Wir setzen unsere Untersuchungen in dieser Richtung weiter fort.

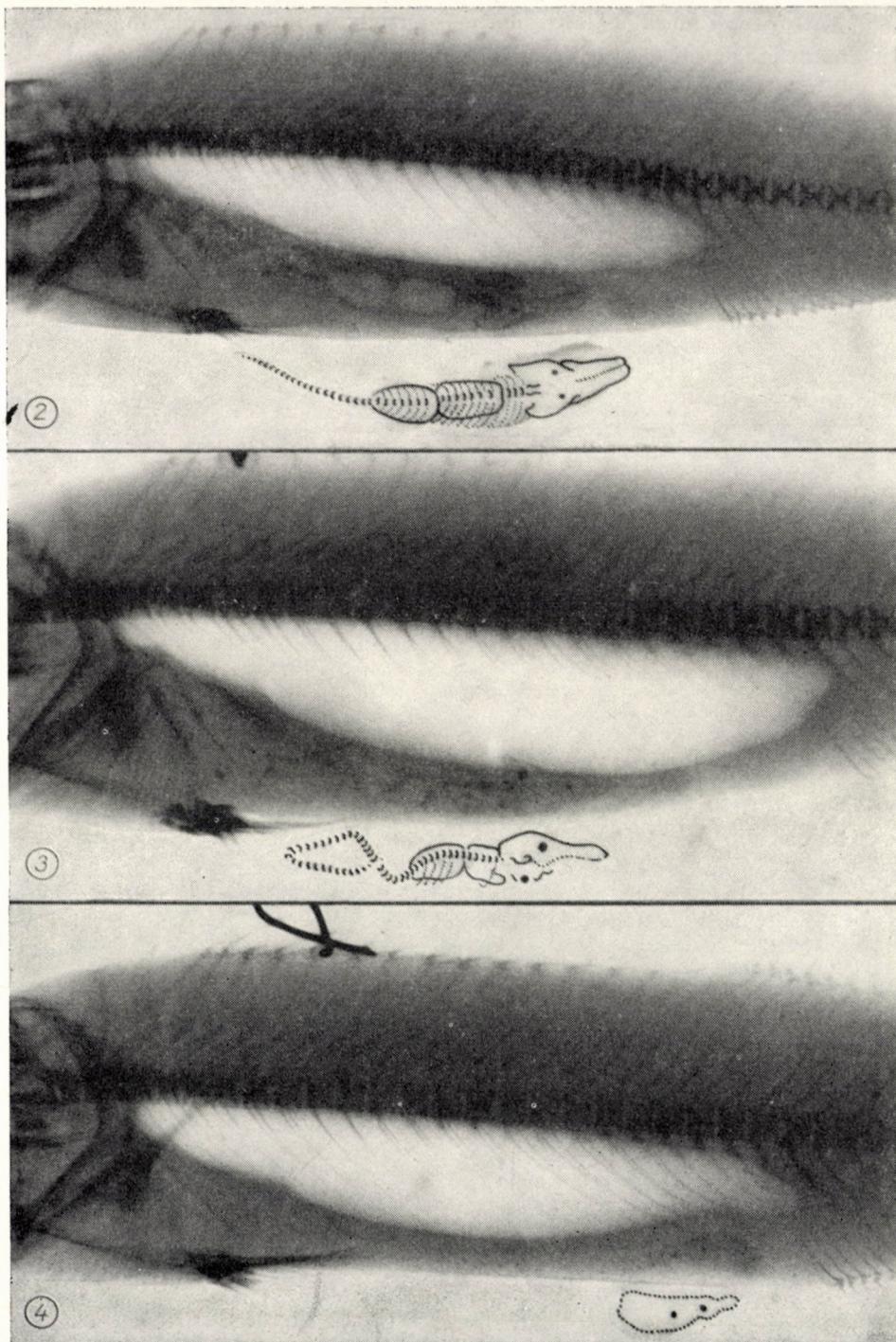


Abb. 2—4. Röntgenaufnahme eines Zanders in verschiedenen Phasen der Verdauung.  
Die Zeichnungen geben die Lage der Knochen des Nahrungsfisches an

Mit unserer Methode lässt sich vermutlich auch die Verdauung sonstiger, mit einem Magen ausgestatteter Raubfische untersuchen.

#### LITERATUR

1. DUBETS, H. (1954) Feeding habits of the largemouth bass as revealed by a gastroscope. *Prog. Fish-Cult.*, **16**, 134—136.
2. ENTZ, B. LUKACSOVICS, F. (1957) Untersuchungen im Winterhalbjahr an einigen Balaton-See Fischen zwecks Feststellung ihrer Ernährungs-, Wachstums- und Vermehrungs-umstände. *Annal. Biol. Tihany*, **24**, 71—86. (Ungarisch, mit deutscher Zusammenfassung.)
3. SEABURG, K. G. (1957) A stomach sampler for live fish. *Prog. Fish-Cult.*, **19**, 137—139.
4. WHITE, H. C. (1930) Some observations on eastern brock trout (*S. fontinalis*) of Prince Edward Island. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **69**, 101—105.
5. WOYNÁROVICH, E. (1958) Ein Gerät zur quantitativen Prüfung des Mageninhaltes von Raubfischen. *Z. Fischerei*, **7**, 549—554.
6. WOYNÁROVICH, E. (1959) Ernährung der 300—500 g schweren Zander (*Lucioperca sandra* CUV. et VAL.) im Balaton. *Annal. Biol. Tihany*, **25**, 101—120. (Ungarisch, mit deutscher Zusammenfassung.)

#### RÖNTGENOLOGIC INVESTIGATION OF THE DURATION OF GASTRIC DIGESTION IN THE PIKE-PERCH (LUCIOPERCA LUCIOPERCA L.)

The paper describes a new method for the determination of the length of time required by the pike-perch (*Lucioperca lucioperca L.*) for gastric digestion. The new radiographic method makes it possible to keep the animals alive throughout the duration of the experiment. While the method enables us to ascertain the time of digestion in the stomach with great accuracy, it is not suitable for making similar observations in the intestines.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖЕЛУДОЧНОГО ПЕРЕВАРИВАНИЯ У СУДАКА (LUCIOPERCA LUCIOPERCA L.) РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Авторы дают описание нового метода для исследования продолжительности желудочного переваривания у судака (*Lucioperca lucioperca L.*). При помощи описанного рентгенологического метода дается возможность сохранить жизнь исследованных рыб до окончания эксперимента. Благодаря этому переваривание можно проследить до опорожнения желудка. Данный метод пригоден только для точного установления продолжительности времени переваривания в желудке, в то время как для наблюдений переваривания в кишечнике он непригоден.

GYULA MOLNÁR, Gödöllő, Agrártudományi Egyetem, Ungarn.  
ISTVÁN TÖLG, Tihany, Biologia, Ungarn.

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ÖKOLOGIE DES SENFKÄFERS (COLAPHELLUS SOPHIAE SCHALL.)

GY. SÁRINGER

FORSCHUNGSIINSTITUT FÜR PFLANZENSCHUTZ, BUDAPEST (VORSTAND: G. SZELÉNYI)

(Eingegangen am 22. Februar 1960)

## Zusammenfassung

Im Rahmen des Arbeitsprogrammes, das sich auf die Erforschung der am Raps (*Brassica napus L.*) und Weißen Senf (*Sinapis alba*) lebenden tierischen Vergesellschaftungen richtete, wurde diesmal — auf Grund von 4 Jahre währenden Beobachtungen und Untersuchungen — die Autökologie des in Ungarn bislang als Schädling nicht bekannten, in den letzten Jahren jedoch bedeutende Schäden verursachenden Senfkäfers (*Colaphellus sophiae*) bearbeitet.

Die Imagines überwintern im Boden und beginnen ab Mitte März auf die Oberfläche zu wandern. Nach der Zeugenschaft des Materials, das in 70 Jahren gesammelt wurde, sind die Käfer in Ungarn frühestens in der ersten Dekade des Monats März, spätestens in der ersten Juli-Dekade eingesammelt worden. Auf Ackerflächen konnten Vollkerfe während ihrer Nahrungsaufnahme auf den Kulturpflanzen *Capsella bursa-pastoris*, *Lepidium draba*, *Sinapis alba* sowie auf *Brassica napus f. annua* et *f. biennis* beobachtet werden. Die Kopulation hat schon 1 bis  $1\frac{1}{2}$  Wochen nach ihrer Erscheinung begonnen, und es dauerte nach der Paarung ebenso lang, bis die ersten Eier erschienen. Die Eier wurden in kleineren oder größeren, unregelmäßigen Klümpchen sog. Gelegen zwischen die Bodenkrumen gebettet. In jedem Gelege waren im April i. allg. 27, im Mai 21 und im Juni 30 Eier vorzufinden. Im Freiland fällt die letzte Periode der Eiablage auf Mitte Juli.

Die Larven häuteten sich dreimal, haben also vier Entwicklungsstadien. Ihr Leben vollzieht sich auf der Pflanze. Nach Beendigung der Nahrungsaufnahme kriechen sie zum Boden herab und vergraben sich, sobald sie eine passende Stelle gefunden haben, in der Erde, wo sie eine Puppenkammer (Puppenwiege) herrichten und sich darin verpuppen. Ein großer Teil der Imagines verblieb nach der zum Vollkerf führenden Häutung (Umwandlung) im Boden bis zum nächsten Frühjahr, ein kleiner Teil kam jedoch nur nach zweimaliger Überwinterung zum Vorschein. Einige Imagines krochen im September aus dem Boden zur Oberfläche, nahmen ein wenig Nahrung zu sich, verzogen sich aber bald zur Überwinterung in die Erde. Bei den Larven, die auf den Pflanzen *Sinapis alba*, *S. arvensis*, *Brassica napus f. biennis*, *Lepidium draba* und *Capsella bursa-pastoris* in Einzelzuchten gezogen wurden, nahm das Larven-, Vorpuppen- und Puppenstadium insgesamt 34,4 bis 35,8 Tage in Anspruch. In der Entwicklungsgeschwindigkeit der auf den erwähnten Pflanzen gezogenen 50—50 Larven zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede, nur hatten die auf den Weißen Senf gesetzten ein höheres Gewicht; dies deutet darauf, daß bei gleicher Entwicklungsgeschwindigkeit die Nahrungsaufnahme aus *Sinapis alba* ein größeres Ausmaß erreicht. Nach den Ergebnissen der auf die Nahrungswahl gerichteten Untersuchungen ist der Senfkäfer als ein an mehreren Wirtspflanzen fressenden Tier zu betrachten. Da er von allen in den Versuch gestellten Pflanzen *Sinapis alba* bevorzugte, erhielt er die Bezeichnung Senfkäfer. Weitere Untersuchungen erbrachten den Beweis, daß die Imagines 3 bis  $3\frac{1}{2}$  Monate lang in der Diapause verbleiben müssen, um ihre Lebensaktivität beginnen zu können. Bei dem Senfkäfer handelt es sich also um eine echte Diapause.

Der Senfkäfer bringt in Ungarn nur eine Generation hervor.

## Einleitung

Vor einigen Jahren wurde die Erforschung der auf Raps (*Brassica napus L.*) und Weißem Senf (*Sinapis alba L.*) lebenden tierischen Vergesell-

schaftungen als Ziel gesteckt. Doch schon bald nach Beginn kam die Arbeit ins Stocken. Es stellte sich überraschenderweise heraus, daß die Erforschung der nach den Grundsätzen einer zeitgemäßen Agrozönologie feststellbaren Tiergesellschaften nur dann möglich ist, wenn vorerst die Autökologie der an der Vergesellschaftung teilnehmenden Arten genau geklärt wurde. Eine Übersicht der ungarischen Literatur zeigte, daß nicht nur über die Lebensweise der an den genannten Pflanzen schmarotzenden Populationen keine detaillierten Angaben zur Verfügung stehen, sondern daß nicht einmal alle auf den beiden Pflanzen vorkommenden Schädlingsarten bekannt sind. Hier soll bloß ein Beispiel angeführt werden. Der im Stengel des Rapses alljährlich in großen Mengen auftretende Art *Ceuthorrhynchus quadridens* PANZ. wird in der ungarischen Pflanzenschutzliteratur überhaupt keine Erwähnung getan, demgegenüber aber der Art *Ceuthorrhynchus pleurostigma* MRSH. — die mutmaßlich nur sehr selten Schaden anrichtet — eine größere Rolle zugeschrieben.

Nach dieser Vorgeschichte hatte die erste Aufgabe des Arbeitsprogramms die autökologische — womöglich mehrere Jahre andauernde — Erforschung der Populationen der auf den beiden Pflanzen lebenden Schädlingsarten zu sein. Diese Bestrebungen fanden in der im Jahre 1957 erschienenen Monographie über die Rapsblattwespe (*Athalia rosae* L.) [18] ihren ersten Niederschlag. Die hier veröffentlichte Abhandlung befaßt sich mit dem in Ungarn als Senf-schädling bisher nicht bekannten *Colaphellus sophiae*. Es werden nur die Ergebnisse der ökologischen Untersuchungen dargeboten, die eingehende morphologische Beschreibung der Entwicklungsformen erscheint in einer anderen Arbeit [20]. Die Wahl fiel deswegen auf *Colaphellus sophiae*, weil im Beobachtungsgebiet (in Keszhely und Umgebung) dieser Schädling im Jahre 1956 auf dem Weißen Senf (*Sinapis alba* L.) einen Laubverlust von 25 bis 30 vH, i. J. 1957 35 bis 40, und 1958 70 bis 80 vH verursachte, ferner weil er in Ungarn bisher unbemerkt blieb und in Europa kaum bekannt ist.

Die Beobachtungen und Untersuchungen erstreckten sich auf den Weißen oder Englischen Senf (*Sinapis alba* L.), denn der Schwarze oder Französische Senf (*Brassica nigra* [L.] KOCH.) wird im Untersuchungsgebiet — teils zufolge seiner Frostempfindlichkeit, teils aber weil er für Fütterungszwecke ungeeignet ist — nicht angebaut.

### Die Erscheinung der Imagines im Frühjahr und ihr Verhalten

Nach den bisherigen Untersuchungen beginnen die bis zu einer Tiefe von 5 bis 10 cm im Boden überwinternden Imagines ab Mitte März nach der Oberfläche zu wandern. Bevor sich der Käfer aus seiner Kammer nach oben begibt, beginnt er vorerst Beine und Fühler lebhaft zu bewegen, steht dann auf und versucht mit den Vorderbeinen die Wand der Überwinterungskammer durchzubrechen. Bei diesem Bestreben spielt auch sein Mundwerkzeug eine

große Rolle. Gelingt sein Vorhaben an einer Stelle nicht, so wird es an einer anderen wiederholt. Der Käfer dringt nicht in jedem Falle in dem der Bodenoberfläche zugekehrten Teil, sondern oft in entgegengesetzter Richtung aus der Kammer. Es kommt vor, daß er sich zuerst auf einer kurzen Strecke von einigen Zentimetern abwärts bewegt und dann sich nach oben dreht. Sein Weg bis zur Oberfläche verläuft nicht gerade, sondern in einer Zickzacklinie. Die Richtung des aufwärts führenden Weges ist wahrscheinlich durch die Bodenstruktur bedingt. Diese Wanderung dauert mehrere Tage, manche Imagines verbleiben inzwischen für einige Tage auf derselben Stelle. Ein Weibchen der Versuchskäfer ist auf halbem Wege zwischen der Überwinterungskammer und der Bodenoberfläche stehengeblieben und richtete sich eine neue Kammer her. Der in die Nähe der Erdoberfläche gelangte Vollkerf fertigt sich eine regelrechte Kammer an, welche eine Öffnung von 4 bis 5 mm Durchmesser nach der Oberfläche hat. Eine ähnliche Oberflächenkammer richten sich auch die Kartoffelkäfer her, die JERMY i. J. 1957 beobachtete. In der Oberflächenkammer halten sich die Imagines 2 bis 16 Tage auf; die Dauer dieses Verweilens hängt vom Zeitpunkt ab, in dem sie die Oberflächennähe erreichten. Die später, Ende April oder Anfang Mai erscheinenden Käfer verweilen bloß 2 bis 3 Tage in einer solchen Kammer. Es gab aber auch einen Vollkerf, der keine Kammer bezog. Die Bedeutung der Oberflächenkammer ist — wie es bei den Kartoffelkäfern festgestellt werden konnte — im »Auskundschaften« der Witterungsverhältnisse zu suchen. Die Käfer können nämlich in dieser nach dem Freiland gehenden Kammer die Temperatur- und Niederschlagsverhältnisse wahrnehmen.

Nach den bisherigen Beobachtungen erschien der erste Käfer im Jahre 1957 am 9. April, 1958 am 2. Mai und 1959 am 11. März an der Oberfläche. An diesen Tagen betrug die durchschnittliche Bodentemperatur in 10 cm Tiefe 9,8°C, 10,5°C und 7,2°C. Die beobachteten Imagines überwinterten im Freien in einem Tongefäß (von 10 bis 12 cm Durchmesser), die Bodentemperaturen beziehen sich auf dieses Gefäß. Kontrollmessungen erbrachten den Beweis, daß zwischen den Temperaturen des in den Boden eingelassenen Überwinterungsgefäßes und jenen des Freilandbodens kein Unterschied zu verzeichnen war. Die aus dem Boden hervorgekommenen Tiere verbleiben nicht endgültig an der Oberfläche, sondern verziehen sich nach einem kürzeren oder längeren Herumtreiben wieder zwischen die Bodenkrumen und halten sich dort für einige Stunden, fallweise 1 bis 2 Tage oder Wochen auf. In der Freilandzucht konnte man öfters beobachten, daß von den zum Vorschein gekommenen Imagines 1 bis 2 Exemplare sich wieder in die Oberflächenkammer verzogen. Dies ist aber als Zufall zu betrachten, denn ein großer Teil der Käfer bohrte sich anderswo in den Boden. Wenn die Lufttemperatur beim Erscheinen der Imagines 10 bis 15°C oder noch höhere Werte betrug, so verzogen sich diese seltener zwischen die Bodenkrumen der Oberfläche, sondern begannen zu

wandern. Dieser Ortswechsel steht mit der Nahrungssuche im Zusammenhang. Nach den Beobachtungen in den Jahren 1958 und 1959 schossen von den Unkrautgewächsen noch keine Kreuzblütler aus dem Boden, die als Wirtspflanzen für die Käfer in Betracht hätten kommen können, bloß der Winter-raps (*Brassica napus L. f. biennis THELL.*) war auf der untersuchten Fläche auf einem größeren Schlag vorhanden, man konnte aber nicht feststellen, ob sich die Käfer da versammelt hätten. Wie die im Labor und Freilandkäfig durchgeführten Untersuchungen zeigten, suchten die Käfer zu dieser Zeit noch keine Nahrung und fraßen sogar bei Labortemperaturen von etwa 20°C nicht, sondern krochen lediglich lebhaft umher. Sie »picken« bloß — wie MÜLLER [10] feststellt — zu dieser Zeit an den Pflanzen. Diese Beobachtun-

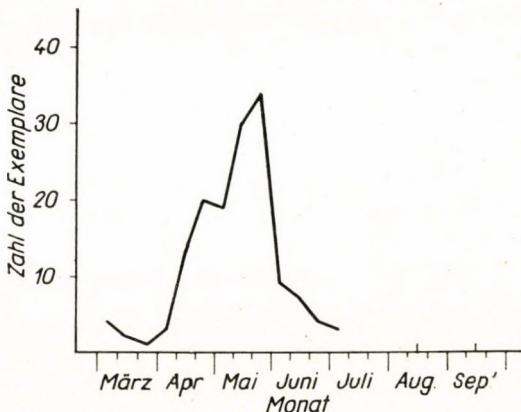


Abb. 1. Die in der Zoologischen Abteilung des Naturwissenschaftlichen Museums vorhandenen, während nahezu 70 Jahren gesammelten Exemplare des Senfkäfers (*Colaphellus sophiae* SCHALL.) nach Zeitpunkten des Sammelns dargestellt

gen zeugen dafür, daß nach dem Erscheinen der Imagines zuerst nicht der Ernährungs-, sondern der Wandertrieb wach wird.

Bei den im Freiland überwinternten Käfern waren in der Zeit, die zwischen dem Erscheinen der ersten und letzten Exemplare verstrich, von Jahr zu Jahr große Unterschiede zu verzeichnen. So kam z. B. 1957 der erste Käfer am 2. Mai, 1959 am 11. März, der letzte im Jahre 1958 am 22. Mai und 1959 am 19. Mai auf die Oberfläche. Außer den an das Tageslicht gelangten Imagines verbleiben zahlreiche noch im Boden, diese kriechen nur im nächsten Frühjahr, also nach zweimaliger Überwinterung hervor [p. 137—139]. Die Verzögerung des Erscheinens ist offensichtlich mit den Schwankungen der Bodentemperatur im Zusammenhang. Am 8. Mai 1958 stieg die Durchschnittstemperatur auf über 20°C, dadurch wurden die überwinternden Käfer rasch hervorgelockt und deshalb dauerte auch der Frühjahrsflug bloß 20 Tage. Im Jahre 1957 war die Temperatur sowohl zur Zeit des Erscheinens der ersten

Vollkerfe als auch später weit unter 20°C geblieben, deshalb verzögerte sich ihr Flug und nahm 39 Tage in Anspruch. Im Jahre 1957 kamen 50 vH der Imagines am 29. April, 1958 am 17. Mai hervor. Die Zahl der erscheinenden Exemplare kulminierte im Jahre 1957 in der ersten Maiwoche, 1958 Mitte Mai. Vollkerfe konnten nur am Boden und an den Pflanzen kriechend, nie aber beim Flug beobachtet werden. MÜLLER [10] sah im Labor und im Freiland fliegende Individuen. Die Häufigkeit des Vorkommens der Käfer wurde auf Grund der Sammlung der Zoologischen Abteilung des Naturwissenschaftlichen Museums festgestellt. Die Imagines von *C. sophiae* in diesem Material sind das Ergebnis einer nahezu 70 Jahre umfassenden Sammlerarbeit; die nach dem Datum des Einsammelns durchgeführte Summierung der Käfer ist in Abb. 1 dargestellt. Aus dem Verlauf der Kurve ist es ersichtlich, daß sie frühestens in der ersten Dekade des Monats März und spätestens in der ersten Juli-Dekade eingefangen wurden. Die auf der Abb. 1 für August und September vermerkten Sammlungszeitpunkte sind tatsächlich möglich, doch die in diese Periode eingefangenen Vollkerfe sind nicht überwinterte, sondern bereits im Boden diapausierende Exemplare, von denen ein ganz geringer Prozentsatz Ende Sommer auf die Oberfläche gelangen kann. Wie die Kurve zeigt, wurden im Durchschnitt der Jahre die meisten Imagines in der letzten Dekade des Monats Mai gefangen. Ihre Zahl erhöht sich ab Anfang April schlagartig und nimmt dann ab Ende Mai rapid ab.

#### *Die Nahrungsaufnahme der Vollkerfe*

Wie bereits bei der Besprechung ihres Erscheinens erwähnt wurde, beginnen die Imagines nicht sofort nach der Erlangung der Oberfläche zu fressen, sondern wandern vorerst umher. Die hierzu verwendete Zeit nimmt mit steigernder Temperatur ab. Ihre Dauer betrug i. J. 1958 bei einer Durchschnittstemperatur von 21,5°C bloß 4 Tage, nachher setzte die Nahrungsaufnahme ein. Es wurde untersucht, ob die Käfer vorher Wasser zu sich nehmen müssen, oder auch ohne solches zu fressen imstande sind. Sie wurden in zwei Gruppen geteilt und in beide sowohl Männchen wie Weibchen gesetzt. Die eine Gruppe kam in eine Petrischale auf trockene, die zweite in eine auf nasse Watte. Tags darauf erhielten beide Gruppen Senfblätter, die vorher mit Filterpapier abgetrocknet wurden. Nachher richteten sich die Beobachtungen darauf, ob zwischen den Käfern, die aus der nassen Watte Wasser zu sich nehmen konnten und jenen, die mit Wasser nicht in Berührung kamen, in der Nahrungsaufnahme irgendein Unterschied zu verzeichnen sei. Es zeigte sich, daß die Individuen beider Gruppen die Senfblätter in gleichem Maße verzehrten. Die Wasseraufnahme ist also keine Voraussetzung für den Beginn des Fraßes. Die Imagines der künstlichen Zuchten haben ihre Nahrungsaufnahme am 4. bis 5. Tage nach ihrem Erscheinen auf der Oberfläche begonnen: Sie befraßen vorerst unregelmäßig die am Ende des Triebes stehenden jungen Blätter und wandten sich später als die Pflanze zu sprühen begann, mit Vorliebe den Knospen zu. Es wurden die gelben Blumenblätter, die Narbe und auch die Staubbeutel tragenden Staubfäden verzehrt (12. Juli 1958). Der Beginn der Nahrungsaufnahme wird durch die rege Kotproduktion angezeigt, die besonders im Gipfelteil der Pflanze, an der Ober- und Unterseite der Blätter sowie am Stengel in gleicher Weise vor sich geht. Der frische Kot ist von graugelber Farbe, und enthält halbmondförmige feste Teile.

Während der Nahrungsaufnahme (Abb. 2) wurden im Frühjahr auf folgenden Pflanzen Vollkerfe gesammelt: auf *Capsella bursa-pastoris* L., *Lepidium draba* L., die in Blüte standen, auf *Sinapis arvensis* L., dessen Stengel etwa 15 cm hoch war sowie auf *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis alba* L. und *Brassica napus* L. f. *annua* Thell. et f. *biennis* Thell. zur Zeit der Blüte.

In der täglichen Bewegung der Imagines kann man eine gewisse Regelmäßigkeit entdecken. Sie verziehen sich zum größten Teil in den Abendstunden zwischen die Bodenkrumen,

verbringen dort die Nacht und beginnen erst am nächsten Tag um 8 bis 9 Uhr wieder auf die Pflanzen zu kriechen und zu fressen. LEGATOW [7] und MÜLLER [10] machten im Zusammenhang mit der täglichen Bewegung der Vollkerfe ähnliche Beobachtungen.

Die Nahrungsaufnahme ist nicht kontinuierlich. Die Käfer fressen in den Morgenstunden weniger als um die Mittagszeit. Ihre Bewegung ist bei glühendem Sonnenschein angeregter, sie lassen besonders ihre Fühler lebhafter spielen und kriechen im oberen Teil der Pflanze umher. Die Nahrungsaufnahme setzt auch bei trübem Wetter und Regen nicht aus. Am 9. Juni 1958 wurden die auf Senf fressenden Imagines bei einem Gewitter beobachtet. Der starke Platzregen am Nachmittag wusch sie teilweise zu Boden, der andere — u. zw. größere — Teil verkroch sich auf die Unterseite der Blätter und fraß dort weiter oder verharrete regungslos an einer Stelle.

Bezüglich der Nahrungsaufnahme der Weibchen konnte die interessante Beobachtung gemacht werden, daß sie — zwar sehr selten — fallweise auch ihre eigenen Eigelege verzehren.

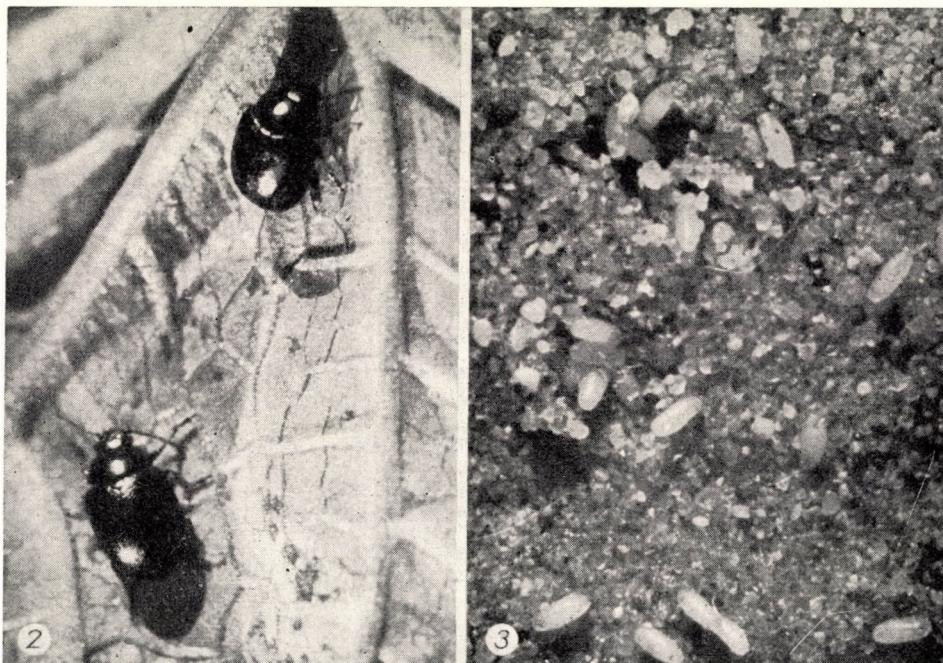


Abb. 2. Senfkäfer-Imagines an der Blattunterseite des Weißen Senfs. (Photo: REICHART)

Abb. 3. Eier des Senfkäfers zwischen den Bodenkrumen (Photo: REICHART)

Der Grad der Nahrungsaufnahme wurde bei im Frühjahr erschienenen, noch vor Fraßbeginn stehenden Käfern männlichen und weiblichen Geschlechts ebenfalls erforscht. Es wurden die Gewichtsveränderungen bei 10 Männchen und bei 10 Weibchen sowie die Menge der durch diese verzehrten Blätter (in g) festgestellt (Untersuchungsmethode siehe [21]). Die Untersuchung dauerte vom 10. Mai bis zum 20. Juni 1958. In den 41 Tagen der Nahrungsaufnahme verzehrten die Weibchen durchschnittlich 1,8466, die Männchen je 1,0318 g von den grünen Senfblättern. Inzwischen legten erstere 127 Eier. Während dieses Geschäftes stieg ihre Nahrungsaufnahme immer an. Die für die Zeit der Kopulation zusammengeschlossenen Männchen und Weibchen erhielten keine Nahrung. Von ersteren gingen im Laufe des Versuches 3, von letzteren 5 Exemplare ein. Das durchschnittliche Gewicht der weiblichen Imagines betrug zur Zeit ihres Erscheinens auf der Oberfläche 13,1 mg, und erreichte während des Versuchs den Maximalwert von 14,7 mg. Das Durchschnittsgewicht der Männchen war bei ihrem Erscheinen bloß 8,7 mg und stieg maximal bis 11,1 mg an. Der Verlauf der Nahrungsaufnahme zeigte bei den Käfern beiderlei Geschlechts kein einheitliches Bild. Während der Untersuchungszeit

haben nach Beginn der Fraßtätigkeit die Weibchen zwischen dem 10. und 15. Tag, die Männchen vom 20. bis zum 25. Tag die größten Nahrungsmengen zu sich genommen.

Männchen, die man nicht huntern ließ, lebten in den verschiedenen Zuchten 25 bis 105 Tage lang. In einem Versuch von MÜLLER [10] hatten die Imagines eine Lebensdauer von 49 Tagen. Seinen Angaben nach endet das Leben der Männchen früher als das der Weibchen.

Die hochgradige Widerstandsfähigkeit, welche die Vollkerfe der Luftfeuchtigkeit gegenüber bekunden, ist auch durch den im Winter 1956/57 durchgeführten Versuch bewiesen. Bei diesem wurden während des ganzen Winters in einem leeren Reagenzglas, das in einem ständig geheizten Stockwerkzimmer untergebracht war, 3 weibliche und 8 männliche Imagines gehalten. Von diesen Tieren gingen 2 Weibchen und 6 Männchen ein, die übrigen überwinterten und wurden im März aktiv.

### Kopulation

Wenn die Frühjahrstemperatur  $18^{\circ}\text{C}$  überschreitet — dies erfolgt gewöhnlich 1 bis  $1\frac{1}{2}$  Wochen nach dem Erscheinen der Käfer — beginnt die Paarung. MÜLLER [10] beobachtete auch am Tage nach ihrem Erscheinen schon Begattungstätigkeit. Kopulation findet auch dann statt, wenn weder das Männchen, noch das Weibchen Nahrung zu sich genommen haben. Nach Nahrungsaufnahme ist die Kopulation noch intensiver. Auch MÜLLER [10] berichtet über häufige Paarung in solchen Fällen. Es kann vorkommen, daß das Weibchen während der Kopulation das Männchen an ihrem Rücken herumschleppt, doch meist vollzieht sich der ganze Akt auf einer und derselben Stelle. Nach den Beobachtungen nahm der Paarungsakt 5 bis 37 Minuten in Anspruch. Das Weibchen kann täglich mehrmals kopulieren. Die Männchen sind imstande nach der Befruchtung eines Weibchens sofort mit einem anderen zu kopulieren. Die meisten Paarungen wurden bei Temperaturen von 23 bis  $25^{\circ}\text{C}$  beobachtet. Während der Paarung kann das Weibchen auch Nahrung zu sich nehmen. Die Kopulationsperiode ist nicht auf 1 bis 2 Tage beschränkt, erstreckt sich sozusagen auf das ganze Leben der Käfer. Vor Beginn der Eiablage paaren sie sich jedoch seltener. Der Akt kann auf einer beliebigen Stelle der Pflanze sowie zwischen den Bodenkrumen stattfinden. In seiner Häufigkeit zeigten sich keine Unterschiede.

### Eiablage

Die Weibchen beginnen i. allg. 1 bis  $1\frac{1}{2}$  Wochen nach dem ersten Kopulationsakt ihre Eier zu legen. In den Zuchten gab es auch solche, die trotz wiederholter Kopulation nur 27 Tage nach ihrem Erscheinen die ersten Eier legten. Wie bei den übrigen Tätigkeiten der Tiere, zeigten sich auch im Beginn des Eierlegens große individuelle Unterschiede.

Das für Eiablage reife Weibchen kriecht von der Pflanze herab und fängt an — sich zwischen den Bodenkrumen verbergend — ihre Eier zu legen. Eine Berührung des Bodens mit dem Körper des Weibchens ist für den Beginn der Eiablage wahrscheinlich erforderlich, denn in einem mit glattem Filterpapier von innen verkleidetem Zuchtkessel hatten die Tiere nur später und notgedrungen ihre Eier gesetzt. Wurde aber der Boden des Gefäßes mit zerknüllten Streifen des Filterpapiers bedeckt, so war im Beginn der Eiablage — gegenüber den Bodenkrumen enthaltenden Zuchten — keine Verzögerung zu verzeichnen. Die Weibchen drängten sich mit Vorliebe zwischen die zerknitterten Papierstreifen und legten ihre Eier auf den verborgensten Stellen ab. In jenen Zuchten, in denen die Zahl der Eier bestimmt werden sollte, wurde der Boden der Zuchtkessel mit zerknüllten Papierstreifen bedeckt, da eine genaue Zählung der zwischen den Bodenkrumen gelegten Eier auf Schwierigkeiten stieß.

Die Weibchen legen ihre Eier größtenteils im wahren Sinne des Wortes in sog. »Klümpchen« (Gelege), in welchem die Eier unregelmäßig angehäuft sind. Da die Oberfläche der Eier nur schwach klebrig ist, haften sie nicht aneinander, lösen sich also — mit einem Pinsel oder mit Erdkrumen in Berührung kommend — leicht voneinander und rollen auseinander. Nicht alle Eier bilden Gelege, sie bleiben oft vereinzelt oder es werden 2 bis 3 Stück unmittelbar nebeneinander gelegt (Abb. 3). Im Freiland fanden wir nicht nur zwischen den Bodenkrumen, sondern auch an 2 bis 3 cm aus dem Boden ragenden, abgestorbenen Pflanzenresten Eier, diese hafteten aber nicht an der Pflanze, sondern waren darauf hängengeblieben. Viele Eier sind z. B. unter den sich der Bodenoberfläche anschmiegenden Blättern von *Capsella bursa-pastoris* oder *Lepidium draba* zu finden. Ein großer Teil der Eier wird in der Nähe der Pflanzen gelegt, man findet sie aber auch weiter von diesen entfernt. Am 9. März 1957 lagen 3 Eigelege auf 74 cm von der nächsten Wirtspflanze, waren aber nicht streng voneinander getrennt, sondern standen durch fallengelassene Eier miteinander in Verbindung. Auf der Pflanze selbst wurden

im Freiland nie Eier gefunden, in Gefangenschaft gehaltene Weibchen haben aber in vielen Fällen ihre Eier zwischen die oberen, zufolge der Welke zusammengerollten Blätter der Pflanze gelegt. Das zwischen solche Blätter geklemmte Weibchen hat mutmaßlich dieselben mechanischen Reize von den Blättern erhalten, welche von den Bodenkrümen ausgeübt werden.

Über die Unterbringung der Eier finden wir abweichende Angaben in der Literatur. Nach MULDER [zit. 12] legt das Weibchen seine Eier auf die Bodenoberfläche. Demgegenüber stehen die Beobachtungen von RITZEMA BOS [12] und SACHAROW [16], wonach die Eier auf der Unterseite der Blätter zu finden sind. RITZEMA BOS [12] bemerkt noch außerdem, daß die Eier schwach am Blatt haften und schon auf eine bloße Berührung herunterfallen. In den Versuchen MÜLLERS [10] haben die Weibchen ihre Eier in den Boden und mitunter auch auf dessen Oberfläche gelegt. Bei seinen vielen Versuchen fand er nur ein einzigesmal Eier zwischen den dichten Blättern von *Sisymbrium loeselii*, betrachtet aber diesen Fall selbst als eine Ausnahme.

In den Monaten April, Mai und Juni wurde in je 100, von mehreren Weibchen produzierten Eigelegen die Zahl der Eier festgestellt. Im April kommen durchschnittlich 27, im Mai 31 und im Juni 30 Eier auf ein Gelege. MÜLLER [10] zählte 43 Eier im größten Gelege.

Im Frühjahr 1957 wurde der Prozeß der Eiablage und die Gesamteiproduktion in 7 Zuchten — die je 2 Männchen und 2 Weibchen enthielten — überwacht. Die Imagines kamen Ende April, Anfang Mai zum Vorschein und legten bis zum Beginn des Zuchtprozesses keine Eier. Das Zuchtgefäß war ein Glaszyylinder von 11 cm Durchmesser und 12 cm Höhe, der in eine Petrischale gesetzt und mit Leinen zugedeckt wurde. Als Boden des Zylinders dienten Filterpapier bzw. zerknüllte Streifen dieses Materials. Die Käfer erhielten täglich Senfblätter, die ihnen in einer mit Wasser gefüllten Glashöhle verabreicht wurden, in welchem die Blätter von einem Wattepfpfen festgehalten waren. Die Eier wurden bei Nahrungswechsel mit Hilfe eines Pinsels herausgehoben und sodann gezählt. Der Gang der Eiablage je Zuchten ist auf Abb. 4 veranschaulicht. Auf der Abszisse ist die Zeit, auf der Ordinate die Zahl der Eier dargestellt. Wie aus dieser Abbildung ersichtlich, war die Eiproduktion im Laufe des Monats Mai, d. h. in der Periode nach Beginn der Eiablage, auffallend größer als später. Die Zuchten waren in einem Glashauslabor untergebracht, wo die Temperatur während der Versuchszeit zwischen 17,0 und 24,5° C schwankte. Die im Mai verzeichnete höhere Eiproduktion kann nicht als temperaturbedingt angesehen werden, da sich die täglichen Durchschnitts- und Extremwerte der Temperatur in gleicher Weise bis zum Absterben der Käfer änderten. Auch im Juni erwies sich die Eiablage noch ziemlich lebhaft, nahm jedoch von diesem Zeitpunkt an bis zum Absterben der Weibchen allmählich ab. Wie die Untersuchungen zeigten, legten die Weibchen der 7 Zuchten im Laufe ihres Lebens je 646, 222, 587, 359, 494, 352 und 322 Eier. Bei Verzehrung von Senfblättern legten also die Weibchen durchschnittlich 426 Eier. MÜLLER [10] stellte als Höchstwert 344 Eier je Weibchen fest.

Es wurde auch der Einfluß der verschiedenen Nährpflanzen auf das Ausmaß der Eiproduktion — unter den vorher beschriebenen Bedingungen — geprüft; die Zuchten enthielten jedoch nicht je zwei Paare der Käfer, sondern 5 Männchen und 5 Weibchen. Jede Pflanze war in zwei Zuchten vertreten.

In den Versuchen wurden die Blätter folgender Pflanzen als Nahrung geboten: *Lepidium draba* L., *Capsella bursa-pastoris* L. und *Sinapis arvensis* L. Bei der Fütterung mit *Lepidium draba* haben die Weibchen durchschnittlich 207, bei *Capsella bursa-pastoris* 187 und bei *Sinapis arvensis* 239 Eier gelegt. Diese Untersuchungen beweisen, daß die Wirtspflanze in der Gestaltung der Eiproduktion eine große Rolle spielt. Die meisten Eier (426 Stück) haben die Senfblätter verzehrenden Weibchen gelegt, etwa die Hälfte dieser Leistung wiesen jene auf, denen *Lepidium* und *Sinapis arvensis* verabreicht wurden. Am geringsten war die Eiproduktion bei den mit den Blättern von *Capsella bursa-pastoris* gefütterten Weibchen.

In der Frage, wann die Weibchen im Freiland ihre letzten Eier legen, konnten aus dem Entwicklungsstadium der auf Senfschlägen mit Kätschern eingefangenen Larven gewisse Schlüsse gezogen werden. Am 29. Juni 1957 befanden sich noch viele L<sub>2</sub>-Larven auf den Senfpflanzen; dies bedeutet soviel, daß sie wahrscheinlich aus 10 bis 15 Tage vorher gelegten Eiern geschlüpft waren. Im Jahre 1958 wurden die letzten L<sub>2</sub>-Larven am 3. Juli eingefangen. Aus diesen Ergebnissen ist es ersichtlich, daß in der Natur die letzte Periode der Eiablage auf Mitte Juni fällt. Für diesen Termin sprechen auch jene Untersuchungen, die mit den am 11. Juni 1958 gesammelten Weibchen angestellt wurden. Von diesen, im Labor gehaltenen Käfern hat ein Weibchen bis zum 24. Juni 82, ein anderes bis zum 30. Juni 87 Eier gelegt, nachher gingen beide ein. Die am 3. Juli 1958 eingefangenen und in das Labor gebrachten 2 Weibchen legten kein einziges Ei und starben am 9. Juli ab. Im Freiland blieben die Weibchen — nachdem sie ihre letzten Eier gelegt haben — noch 3 bis 4 Wochen am Leben.

Es soll noch erwähnt werden, daß die Weibchen auch ohne Befruchtung Eier legen können, diese sind jedoch steril, trocknen ein und gehen binnen wenigen Tagen zugrunde.

*Geschlechtsverhältnis*

Im Frühling des Jahres 1957 — Ende April, Anfang Mai — war das Verhältnis von Männchen und Weibchen 43 : 38, im Jahre 1958 28 : 35. Ende Mai, Anfang Juni dieses Jahres stieg die Zahl der Weibchen gewaltig an (auf 119 Individuen entfielen bloß 83 Männchen). Bei den Ende Juni vorgenommenen Kätscherfängen, aber auch bei anderen Sammlungen betrug das Geschlechtsverhältnis wieder nahezu 1 : 1.

**Die embryonale Entwicklung**

Die durchsichtige Eischale ermöglicht eine gute Beobachtung der embryonalen Entwicklung. In einer mit Hygrostat versehenen Zucht, die im Glashauslabor untergebracht war, verlief die embryonale Entwicklung innerhalb eines Geleges wie folgt: Am zweiten Tag nach der Eiablage nimmt das Ei — besonders an der Berührungsfläche mit dem benachbarten Ei — eine dunklere Farbe an, seine Skulptur wird ausgeprägter, sein Bestand ist völlig homogen. Am 3. Tage sind beide Enden des Eies auffallend dunkler als der mittlere Teil. Grad der Skulptur unverändert. Am 4. Tag nimmt das ganze Ei dieselbe Farbe an, bloß in der Nähe der Spitze erscheinen dorsolateral paarweise untereinander stehend 6—6 braune Punktaugen. Am 5. Tag verliert das Ei, seinen bis dahin gezeigten Glanz und nimmt an beiden Enden eine graugelbe, in der Mitte eine hellgelbe Farbe an. Diese beiden Tönungen sind gegeneinander nicht scharf abgegrenzt, die erwähnten Punktaugen werden mit ihrer rotbraunen Farbe auffallender. Am 6. Tag zeichnet sich ganz zart die gräuliche Kopfkapsel ab. Die Punktaugen bekommen jetzt eine grelle rotbraune Farbe. Das Ei verliert völlig seinen Glanz. Am Tage vor dem Schlüpfen der Larve (d. h. am 7. Tag nach der Eiablage) werden die Körperteile des Embryos samt den Borsten gut sichtbar (Abb. 5). Die Punktaugen sind schwarz, vor dem mittleren Paar erscheinen an beiden Seiten die schwarzen, dem Oberkopf zu gerichteten Fühleranlagen. Unterhalb dieser kann man deutlich die durch in einem Halbkreis angeordnete schwarze Punkte begrenzten Clypei sowie die rotbraunen Mandibeln wahrnehmen. Hinter den letzteren, auf der ventralen Seite des Körpers treten die schwarzen Glieder des ersten und zweiten thorakalen Beinpaars in Erscheinung. Kopfkapsel und Larvenkörper sind von der gleichen graugelben Farbe. Zwischen Kopfkapsel und Prothorax gibt es keine scharfe Grenze, auf diese kann man nur aus der Ausrichtung der Borsten schließen. Die Haare der Kopfkapsel sind nach vorne gerichtet. Hinter ihr ist das Pronotum sichtbar, aus dessen Rand die Borsten entspringen. Die auf den Segmenten des Abdomens befindlichen Borsten sind gegen das Ende des Körpers gerichtet. Am zweiten und dritten thorakalen sowie am ersten abdominalen Segment sind seitlich je drei, auch mit unbewaffnetem Auge gut wahrnehmbare, pechschwarze Eizähne sichtbar. Unterhalb des Eizahnes des zweiten thorakalen Segmentes ist eine winzige, schwarze, ringförmige Stigme; solche Gebilde sind auf beiden Seiten aller Segmente des Körpers vorzufinden.

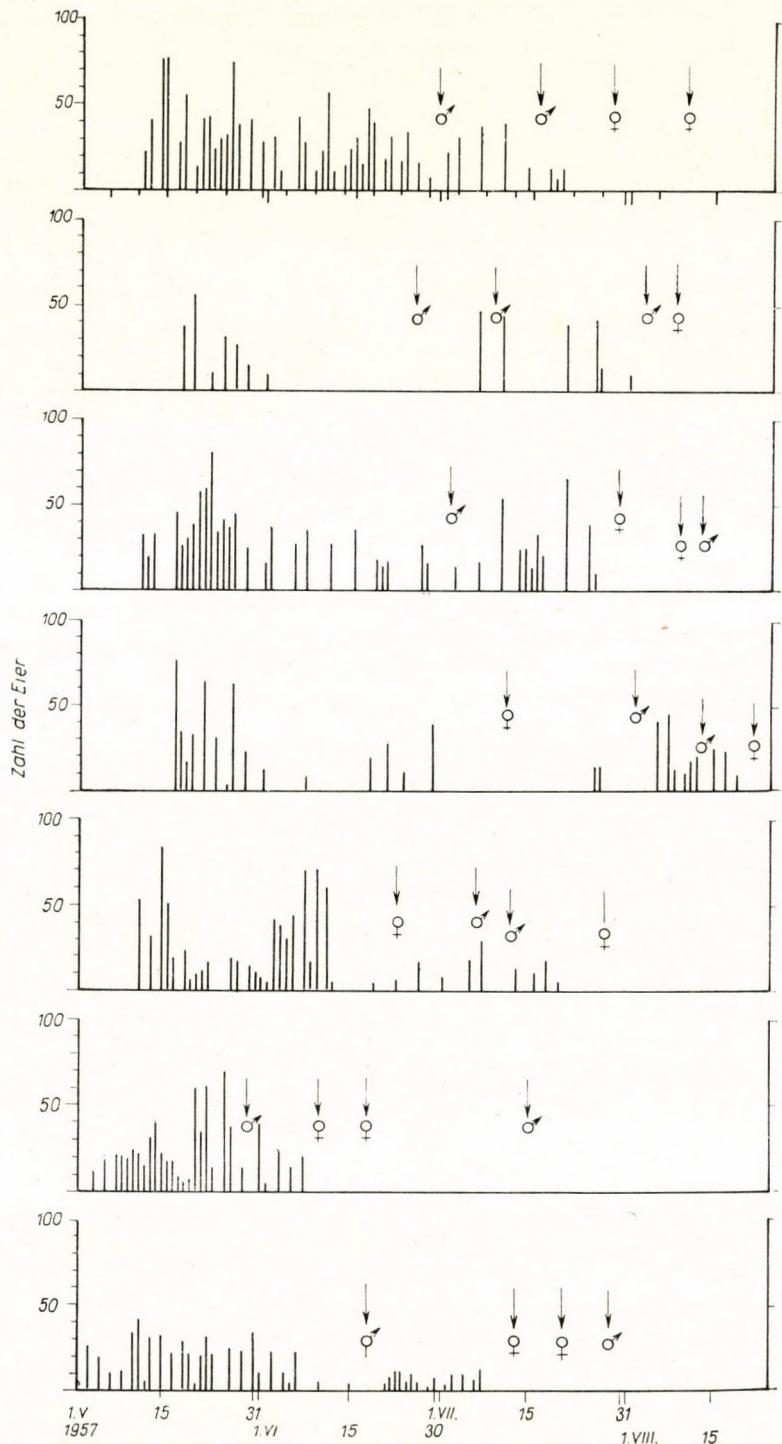


Abb. 4. Verlauf der Eiablage in paarweisen Zuchten (je 2 Männchen und 2 Weibchen enthalten), in denen als Nahrung Blätter von *Sinapis alba* verabreicht wurden. (Die Pfeile zeigen das Absterben der Vollkerfe an)

Am ventralen Teil des Körpers erscheinen ebenfalls die gegen das Ende des Abdomens gerichteten Haare. Die Larve ist in diesem Stadium schon bewegungsfähig. Sie kann ihre Mandibeln, thorakalen Beine auch unabhängig vom Körper bewegen. Sei es, daß sie gesondert einige Körperteile in Bewegung setzt oder daß sich der ganze Körper bewegt, die Eischale bleibt unbeweglich, d. h. sie wird nicht im geringsten runzelig.

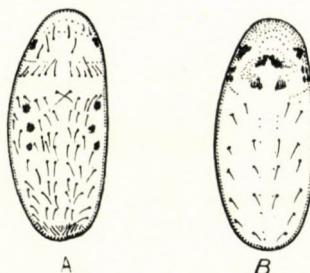


Abb. 5. Durch das Chorion ist der 7 Tage alte Embryo sichtbar. A — dorsale,  
B — ventrale Seite

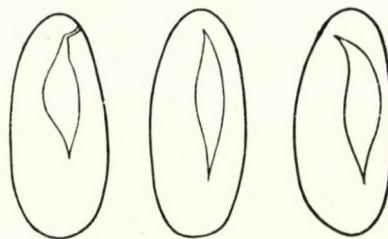


Abb. 6. Typen der Spalten am Chorion beim Schlüpfen der Larven

Das bis zum Schlüpfen (d. h. bis zum 8. Tag nach der Eiablage) am Leben gebliebene Embryo sieht — zufolge der starken Behaarung — mit bloßem Auge betrachtet beinahe grau aus. An diesem Tage sind alle Körperteile des Embryos durch die Eischale auch gesondert gut zu erkennen. In den Stunden vor dem Schlüpfen wird die Bewegung des reifen Embryos derart lebhaft, daß das Ei demzufolge eine Deformation erleidet. Sein mittlerer, zylindrischer Teil wird auf der einen Seite buckelig, die gegen die Kopfkapsel gelegene Partie neigt sich leicht abwärts. Die junge Larve kann dann zufolge des in Längsrichtung erfolgten Aufspringens der Eischale in die Außenwelt gelangen. Im Öffnen der Eischale spielen wahrscheinlich auch die Eizähne eine wichtige Rolle, diesbezüglich liegen jedoch noch keine Beobachtungen vor. Soviel konnte immerhin festgestellt werden, daß die Eischale etwa in der Mitte zu bersten

beginnt und der Riß von hier den Enden zu verläuft. Einige solcher Schlupfspalten sind auf Abb. 6 dargestellt. Die maximale Breite der Spalte beträgt 0,15 mm, ihre Länge 0,43 mm. Die Larve preßt zuerst ihren Kopf, nachher den Thorax und zu allerletzt das Abdomen durch die Spalte. Das Schlüpfen einer Larve — vom Aufspringen des Chorions bis zum völligen Freiwerden — nahm 20 Minuten in Anspruch.

Es wurde auch untersucht, welche Zeit die in Thermostaten verschiedener Temperatur befindlichen Eier eines Geleges für die embryonale Entwicklung benötigen. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse sind in Tab. 1 aufgezeigt. Aus dieser ist es ersichtlich, daß die embryonale Entwicklung am schnellsten

Tabelle 1  
*Dauer der embryonalen Entwicklung*

Temperatur	Kürzeste	Längste	Durch-schnittliche	Mortalität in vH
	Entwicklungs-dauer in Tagen			
16°C	13	15	14	4,0
22°C	8	9	8,5	3,5
27°C	7	8	7,5	—
37°C	—	—	—	100

(durchschnittlich in 7,5 Tagen) bei 27°C verlief, während sie bei 17°C am längsten (durchschnittlich 14 Tage) dauerte. Bei 37°C trockneten die Eier am dritten Tage ein. Die Eier waren in jedem Falle in einer Hygrostatschale untergebracht, ihre Entwicklung ging also bei einer Luftfeuchtigkeit von 100% vor sich. Nach RITZEMA BOS [12] währt die embryonale Entwicklung 9, nach SACHAROW [16] 4 Tage. (Die Temperaturen wurden von diesen Autoren nicht angegeben.) In den Zuchten von MÜLLER [10] nahm die embryonale Entwicklung bei Temperaturen, die von 15,5 bis 25,2°C schwankten, 7 Tage in Anspruch.

Die oben eingehend beschriebene embryonale Entwicklung ging bei wechselnden Temperaturen (zwischen einem Minimum von 16°C und einem Maximum von 25°C) vor sich und dauerte 8 Tage. Die auf diese Periode berechnete Wärmesumme betrug 114°C. In anderen, ebenfalls bei wechselnden Temperaturen gehaltenen Zuchten schwankte die embryonale Entwicklung zwischen 5 und 7 Tagen, wobei die berechnete Wärmesumme 120 bis 150°C erreichte. Die am längsten dauernde embryonale Entwicklung war mit 12 Tagen bei wechselnder Labortemperatur zu verzeichnen; hierbei belief sich die Wärmesumme auf 205°C. Aus der wechselnden Höhe der Wärmesumme

muß man die Folgerung ziehen, daß die Dauer der embryonalen Entwicklung nicht schlechtweg mit diesem Faktor gekennzeichnet werden kann. Wahrscheinlich würde die effektive Wärmesumme, die sich aus der Summe der zwischen Entwicklungsschwellentemperatur und täglicher Durchschnittstemperatur bestehenden Unterschiede ergibt, einen besser kennzeichnenden Wert darstellen, die genaue Ermittlung der Schwellentemperatur der Entwicklung stößt jedoch auf sehr große Schwierigkeiten.

Unter natürlichen Bedingungen ist die Dauer der embryonalen Entwicklung von mehreren Faktoren — z. B. von der Bodenfeuchtigkeit, vom (durch die Farbe und Pflanzendecke des Bodens bedingten) Grad der Insolation — abhängig. — In Ungarn nimmt die embryonale Entwicklung, zufolge der im Mai vorherrschenden Witterungsverhältnisse, 1 bis 1 ½ Wochen in Anspruch. Kalte Nächte im Zeitabschnitt der sog. Eismänner (12. bis 14. Mai) können die Dauer der embryonalen Entwicklung natürlich verlängern. Unter der Einwirkung von schwächeren Frösten gehen die Eier noch nicht zugrunde, bloß die Entwicklung gerät ins Stocken. Bei einer im Labor angestellten Versuchsserie wurden die Ende November 1958 gelegten Eier für zwei aufeinander folgende Nächte bis zu  $-4^{\circ}\text{C}$  gesunkenen Nachttemperaturen ausgesetzt (bei Tag stieg die Temperatur bis  $+3,5^{\circ}\text{C}$  an), und auf die nachher ins Laboratorium gebrachte Zucht wirkte dann wieder eine Temperatur von  $20^{\circ}\text{C}$  ein. Von den 27 Eiern haben sich in 19 Larven entwickelt, die später auch geschlüpft sind. Wenn man bedenkt, daß in Ungarn während der Mainächte die Temperatur an der Bodenoberfläche nur äußerst selten unter  $-4^{\circ}\text{C}$  sinkt, so kann gesagt werden, daß die Entwicklung des Embryos vom Rückgang der Maitemperatur nicht wesentlich beeinflußt wird.

Die Rolle des Niederschlages in der Entwicklung des Embryos wurde ebenfalls einer Prüfung unterzogen. Dies geschah in der Weise, daß Eier verschiedenen Alters für 36 Stunden unter Wasser und nachher auf einen Hygrometer gesetzt wurden. Von den 141 Eiern des Versuches schlüpften aus 97,5 vH Larven, unabhängig davon, in welchem Stadium der embryonalen Entwicklung sich die Eier befanden. Das Chorion erwies sich also als wasserundurchlässig. Es wurden auch solche Larven unter Wasser gesetzt, aus denen die Kopfkapsel der kleinen Larve schon halbwegs zum Vorschein kam. Diese Larven gingen in jedem Falle zugrunde.

Auf natürliche Bedingungen übertragen besagt dieser Versuch soviel, daß von den Eiern, die in einen zufolge stärkerer Regenfälle durchnähten Boden gelangen, nur ein geringer Anteil umkommt, selbst dann, wenn sie eventuell für 1 bis 2 Tage unter Wasser geraten. Dem Tode verfallen jedoch unbedingt die gerade ausschlüpfenden oder bereits geschlüpften Larven, wenn sie sich noch auf dem Boden befinden. Falls sie aber ihre Nährpflanze aufgesucht haben, dann kann ihnen der Niederschlag keinen Schaden mehr zufügen, da sie sich verhältnismäßig fest an die Unterseite des Blattes klammern.

### Entwicklung der Larven und Puppen

Die Larve, die sich durch die längsgerichtete ununterbrochene Spalte der Eischale binnen 20 Minuten herausgezwängt hat, scheint für das unbewaffnete Auge grau zu sein, die Lupe enthüllt es jedoch, daß ihr Körper — mit Ausnahme der ihn bedeckenden Borsten — von gelber Farbe ist. Während des Schlüpfens und unmittelbar nachher sperrt die Larve häufig ihre Mundöffnung auf, atmet gewiß Luft ein, um den Körpergewebe entsprechende Festigkeit zu sichern. Die Borsten und Flecken sind so zahlreich, daß sie sozusagen den ganzen Larvenkörper bedecken. Die kleine Larve nimmt ihre endgültige Farbe in 1  $\frac{1}{2}$  bis 3 Stunden nach dem Schlüpfen an. Hierbei werden Kopfkapsel, Halsschild, Beine, Stigmen sowie alle auf den Körpersegmenten sichtbaren Borsten glänzend schwarz und hart. Die Larve bewegt sich zur Zeit der Färbung sehr wenig und hält sich vorwiegend um die Eischale auf.

Die ausgefärbten Larven gelangen über die für sie wahre Berge bedeutenden Bodenkrumen nur langsam vorwärtskommend zu ihrer Nährpflanze. Sie brauchen aber in der Regel keine lange Strecke zurückzulegen, da die Eier nahe zur Pflanze abgesetzt werden. Freilandbeobachtungen zeigten jedoch, daß die aus dem Ei geschlüpfte kleine Larve nicht den kürzesten Weg zu ihrer Nährpflanze nimmt, sondern oft in ganz entgegengesetzter Richtung wandert und sich sogar auf mehrere Meter von der Pflanze entfernt. Die Wanderung der Larven des L<sub>1a</sub>-Stadiums kann mehrere Tage dauern; daß sie trotzdem nicht dem Hungertod anheimfallen, verdanken sie ihrer hochgradigen Hunger-toleranz. L<sub>1</sub>-Larven, die noch keine Nahrung zu sich genommen haben, sind nicht imstande, sich zu häuten; hierzu gilt Nahrungsaufnahme als Vorbedingung. Die während ihrer Wanderung im Schlamm steckengebliebene Larve geht in kurzer Zeit ein. Sobald die Larve ihre Wirtspflanze erreicht hat, besteigt sie diese und ihr weiteres Leben verläuft auf der Pflanze.

Die Larven häuten sich im Laufe ihrer Entwicklung dreimal, haben also 4 Entwicklungsstadien. Nach RITZEMA Bos [12] benötigt ihre Entwicklung einen Monat, währenddessen sie sich 2mal häuten; zwischen den zwei Häutungen verstreicht ungefähr eine Woche. Diese Beobachtung wurde bereits durch die Untersuchungen MÜLLERS [10] widerlegt, der ebenfalls drei Häutungen feststellte. Vor der Häutung gelangen die Larven in eine Ruhepause, während dieser nehmen sie keine Nahrung zu sich und ihr Abdomen schwillt leicht an. Dieses Ruhestadium dauert etwa eine halbe Stunde, dann springt die Larvenhaut vom hinteren Rande des Halsschildes bis zum 4. Segment des Abdomens auf und durch diese Spalte preßt sich langsam der Larvenkörper in die Außenwelt. Die Kopfkapsel springt nur später auf. Die Dauer der ersten Häutung ist sehr unterschiedlich. Es wurden Häutungen beobachtet, die bloß 7 Minuten und solche, die 23 Minuten benötigten. Die letzte Häutung nimmt die längste Zeit in Anspruch.

Die frisch gehäutete Larve verläßt nicht sofort die abgeworfenen Exuvien, sondern das Endsegment ihres Abdomens bleibt mit dieser für 10 bis 20 Minuten in Verbindung. Nachher hinterlegt die Larve eine Strecke von einigen Millimetern, beginnt jedoch nur nach 1 bis 1 1/2 Stunden Nahrung zu sich zu nehmen. Kopfkapsel, Halsschild der frisch gehäuteten Larve sind zitronengelb, ihre Beine graugelb. Auf der dorsalen Seite des Abdomens verläuft in der Mittellinie ein grauer Streifen. Die Spitze des letzten Abdomensegmentes ist zitronengelb. Die Ausfärbung beginnt 15 bis 20 Minuten nach der Häutung. Hierbei werden Kopfkapsel, Halsschild und Beine vorerst grau und erreichen stufenweise ihre glänzende schwarze Farbe. Die Häutung kann auf einem beliebigen Teil der Pflanze erfolgen, es konnten sogar L<sub>3</sub>-Larven beobachtet werden, die sich am Boden häuteten.

Bei den auf Hygrostate gesetzten Laborzuchten, von welchen sich die ihren Fraß beendeten Larven nicht in den Boden verziehen konnten, war die Möglichkeit geboten, die Entwicklung der Vorpuppen und Puppen zu beobachten. Hierbei zeigte sich, daß die Puppen, die sich mit Blättern des Weißen Senfs ernährten, zitronengelb wurden, die auf *Lepidium draba* gezogenen jedoch eine mitisgrüne Farbe angenommen haben. Der Körper der Vorpuppe biegt sich halbmondförmig, verliert seine Fülle (womit natürlich auch eine Gewichtsabnahme verbunden ist) und letzten Endes treten auch die Segmente ausgeprägt in Erscheinung. Die Vorpuppe beginnt in den zur Puppenform führenden Häutung vorangehenden Stunden sich in aussetzendem Rhythmus zu bewegen, dann springt die Larvenhaut auf der dorsalen Seite in V-Form auf und als Ergebnis der letzten, etwa halbstündigen Häutung, kommt die Puppe zum Vorschein. Die Larvenhaut bleibt während der Zeit des ganzen Larvenstadiums mit dem letzten abdominalen Segment in Verbindung.

Thorax und Abdomen der frisch gehäuteten Puppe sind hellgelb, die übrigen Körperteile orangengelb. Durch die zusammengesetzten Augen zieht sich ein brauner Streifen. Die auf den Segmenten des Körpers befindlichen Stigmen sind ringförmig und schwarz. Die nach rückwärts gerichteten Stacheln des letzten abdominalen Segmentes sind an ihren Enden ebenfalls von schwarzer Farbe. Die frisch gehäutete Puppe bewegt ihr Abdomen oft trichterförmig. Zufolge dieser lebhaften Aktion können sich die Exuvien von der Puppe loslösen. Eine ähnliche lebhafte Bewegung ist auch vor der Häutung der Larve zur Imagoform zu verzeichnen. Nach 6 bis 7 Stunden, die auf die Häutung zur Puppenform folgen, nimmt die ganze Puppe eine gleichmäßige zitronengelbe Farbe an, nur der durch die zusammengesetzten Augen längsverlaufende Streifen ist rotbraun. Die kreisrunden Öffnungen der Stigmen und die das Abdomen bedeckenden Haare sind schwarz. Das distale Ende der Mandibeln ist bei der dreitägigen Puppe braun, ihre Stirn graugelb und der die zusammengesetzten Augen durchquerende Streifen ausgeprägter. Unter- und oberhalb des Ansatzes der Fühler ist ein schwarzer Fleck sichtbar. Vorder- und

Hinterrand des Thorax grau, seine Mitte gelb, Enden der Flügelanlagen rauchfarbig, mit einem schwarzen Punkt am Ansatz. Abdominalsegmente an den Gelenken graugelb. Stigmen ausgesprochen schwarz. Beine an den Gelenken und an den Enden der Tarsen grau. 1 bis  $1 \frac{1}{2}$  Tage vor der Häutung zum Vollkerf bewegt die Puppe wieder öfters ihr Abdomen. Da die Exuvien durchsichtig sind, kann man die Färbung der Puppe gut wahrnehmen. Unmittelbar vor der Häutung weisen die zusammengesetzten Augen, Fühler sowie Clypeus und Labialpalpen eine blaue Farbe auf. Das bezahnte Ende der Mandibeln ist braun, ihre übrigen Teile sind gelb. Beine vom Körper abstehend, an den

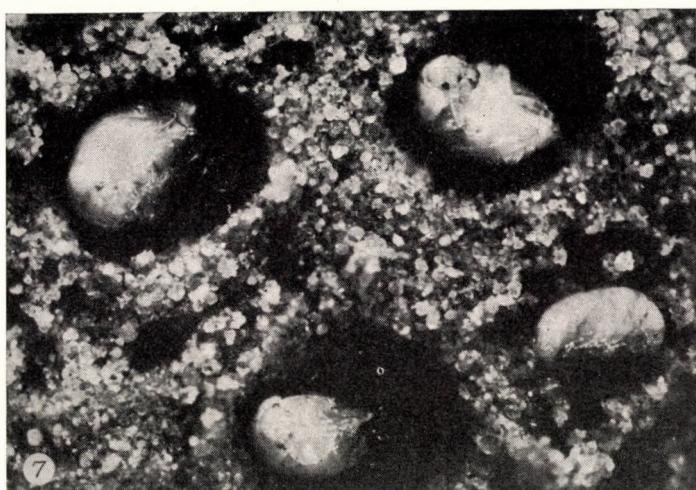


Abb. 7. In der Puppenkammer liegende Senfkäferpuppen. (Photo: REICHART)

Gelenken sowie ein Drittel der Schenkel blau, an den übrigen Stellen gelb. Enden der Flügeldecken stark grau, stehen voneinander auffallend ab. Thorax längs bei Ränder graugelb, in der Mitte blau. Die auffallend kelchförmigen Stigmen sind pechschwarz. Abdomen aufgedunsen, zitronengelb.

Bei der Häutung zum Vollkerf springen die Exuvien zuerst am Thorax in der Längsachse des Larvenkörpers auf und durch diese Spalte wird der Kopf des Käfers frei. Die Häutung nahm bei einer Temperatur von  $22,2^{\circ}\text{C}$  25 bis 33 Minuten in Anspruch. Die vorangehend beschriebene Ausfärbung der Puppe wurde an mit den Blättern von *Sinapis alba* gefütterten Larven beobachtet. Aus den Larven, die auf *Lepidium draba* gezogen wurden, entwickelten sich — in ganz normaler Weise — mitisgrüne Puppen. Unter natürlichen Umweltbedingungen richtet die Larve für ihr Puppenstadium eine Puppenwiege (Puppenkammer) im Boden her (Abb. 7). In den künstlichen Zuchten des Verfassers gab es jedoch Larven — zwar mit sehr geringem Prozentsatz —

die sich nicht im Boden, sondern auf dessen Oberfläche verpuppt haben. Bei solcher, zwangsläufig auf der Oberfläche erfolgten Verpuppung wurde eine Mortalität von 45 bis 68 vH festgestellt.

Die Dauer des Larvenzustandes bei auf verschiedenen Wirtspflanzen gezogenen Larven zeigen die Abbildungen 8 bis 12 an. Das Larvenstadium

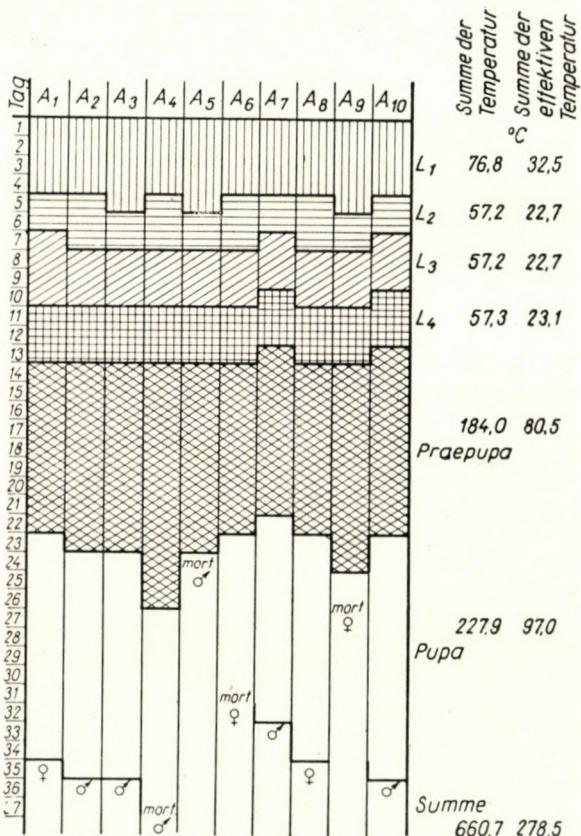


Abb. 8. Entwicklungsdauer von 10 Larven ( $A_1$ — $A_{10}$ ) auf den Blättern von *Sinapis alba* in Einzelzuchten

währte nach RITZEMA BOS [12] 11 Tage, nach SACHAROW [16] 10 bis 12 und nach MÜLLER [10] 16 bis 17 Tage. Letztgenannter hielt seine Zucht in einem Keller von 14,5 bis 19,9°C Temperatur. In seinen übrigen Zuchten, die bei Zimmertemperatur gehalten wurden, nahm das Larvenstadium 11 Tage in Anspruch. In den Laborzuchten des Verfassers gingen 10 bis 15 vH der Larven während der Häutung zum Larvenstadium zugrunde. In diesen Fällen war nur die Haut der Vorpuppe V-förmig aufgesprungen, doch die dadurch sichtbar gewordene Puppe konnte sich nicht freimachen.

Von den am Boden gezogenen Larven verkrochen sich nicht alle zur Verpuppung in den Boden, auch hier kamen Fälle der auf der Oberfläche erfolgten Verpuppung vor. Wenn sich die Larve auf der Oberfläche zum Vollkerf verwandelte, grub sich der Käfer noch vor seiner gänzlichen Ausfärbung in den Boden ein.

Tabelle 2

*Lage der Puppenkammern in verschiedener Bodentiefe am 8. Juli 1957*

Tiefe cm	Zahl der Puppenkammern		%
	♂	♀	
0—5	4	5	12,3
5—10	7	6	17,6
10—15	18	9	37,9
15—20	9	11	26,9
20—25	1	2	4,1
25—30	1	—	1,2

Zur Feststellung der Puppenkammertiefe wurden auf einem mittelschweren Tonboden unter Senfbrache am 8. Juli 1957 Messungen vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Tiefe der Puppenwiegen zeigt natürlich auch jene an, in der sich die Imagines Anfang Juli befanden. Dieser Zeitpunkt muß deshalb betont werden, weil ein großer Teil der Käfer Ende Sommer seine Puppenwiege verläßt und unter- oder oberhalb dieser eine endgültige Überwinterungskammer herrichtet. Wie aus den Angaben der Tabelle 2 ersichtlich, können die Puppenwiegen bis zu einer Tiefe von 30 cm vorkommen. Unter den erwähnten Bodenverhältnissen waren 64,8 vH der Kammern zwischen 10 und 20 cm Tiefe zu finden. Ihre Länge betrug 4,0 bis 5,5 mm, die Breite 3,5 bis 5,5 und die Tiefe, 2,0 bis 3,5 mm. Alle Maße beziehen sich auf die lichte Weite. Weder die Vorpuppe noch die Puppe und nicht einmal der Vollkerf füllen die Kammer vollständig aus, sie nehmen etwa Zweidrittel ihres Luftraumes ein. MÜLLER [10] fand in seinen mit sandiger Erde gefüllten Blumentöpfen bei 12,5 cm Tiefe in Verpuppung begriffene Larven.

Zur Ermittlung der Überwinterungstiefe der Imagines wurden am 26. Oktober 1958 auf dem Versuchsgut Keszhely, in einem solchen Senfschlag Bodenuntersuchungen angestellt, der nach dem Ende Juni erfolgten Schnitt einmal mit der Scheibenegge bearbeitet wurde. Die Beschaffenheit des Bodens stimmte mit der des vorher erwähnten überein. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 3 dargestellt. Zur Zeit der Untersuchung hielten sich 72,3 vH der Imagines in einer Tiefe von 15 bis 25 cm auf, und es ist anzunehmen, daß sie zufolge einer stärkeren Abkühlung der oberen Schichten noch vor Beginn des Winters weiter nach unten wandern. Dies beweist scheinbar

auch die Tatsache, daß in der obersten Schicht (zwischen 0 und 5 cm) kein einziger Käfer vorhanden war. Hinsichtlich der Bevorzugung gewisser Bodentiefen konnten zwischen den Männchen und Weibchen weder im Juli 1957 noch im Oktober 1958 eindeutige Unterschiede gefunden werden.

Tabelle 3

*Das Vorkommen der Imagines in verschiedenen Bodentiefen am 28. Oktober 1958*

Tiefe cm	Zahl der Imagines		%
	♂	♀	
0—5	—	—	—
5—10	3	1	4,8
10—15	7	6	14,2
15—20	14	10	25,4
20—25	19	23	46,6
25—30	8	—	8,7

#### Untersuchung der für die einzelnen Entwicklungsstadien benötigten Zeitdauer in Einzelzuchten

Auf Grund von Kopfkapselmessungen bei den Larven sowie der Zahl ihrer Häutungen wurden bei den Senfkäferlarven 4 Entwicklungsstadien festgestellt [20]. Weitere Untersuchungen sollten darüber Aufschluß geben, wieviel Tage die Larven der einzelnen Stadien für ihre Entwicklung bei Fütterung mit verschiedenen Pflanzen benötigten. Die Untersuchungen wurden in Einzelzuchten durchgeführt und umfaßten folgende Pflanzenarten: *Sinapis alba* L., *Brassica napus* L., f. *biennis* THELL., *Sinapis arvensis* L., *Lepidium draba* L., *Capsella bursa-pastoris* (L.) MEDIK. Als Zuchtgefäß diente ein Hygrostat (Abb. 13).

Der Hygrostat ist eine Butterschale von 12 cm Durchmesser und 5 cm Höhe, die bis zur Hälfte mit Wasser gefüllt wird. Das Gefäß ist mit einem Leinenlappen bedeckt, den ein Gummiring an der Außenwand der Schale festhält. Auf diesen Leinendeckel wird eine Scheibe aus Filterpapier gelegt, deren Durchmesser mit dem des Gefäßes gleich ist. Auf das Filterpapier wird die umgekehrte Hälfte einer Petrischale gelegt, unter diesem entwickeln sich die Tiere. Für Einzelzuchten werden kleinere Petrischalen von 4 bis 5 cm Durchmesser benutzt. Die am Hygrostat gezogenen Tiere leben in einer 100%ig mit Wasserdampf gesättigten Luft. Die Belüftung wird dadurch gesichert, daß man eine Petrischale kleineren Durchmessers als die der Butterschale anwendet. Die hohe Luftfeuchtigkeit im Zuchtraum ist deshalb vorteilhaft, weil die den Tieren verabreichten Blätter für 24 Stunden frisch bleiben. Bei der Zucht von kleineren Larven ist immer darauf zu achten, daß die zur Bedeckung dienende Petrischale nicht anläuft, da in solchem Falle die herumkriechenden kleinen Larven leicht in den von der Petrischale herabhängenden Wassertropfen erstickten. Um dies zu vermeiden, soll man das Innere der Schale mit Filterpapier oder Watte täglich mehrmals abtrocknen.

In den Einzelzuchten wurden für jede Pflanze solche Larven benutzt, die demselben Gelege entstammten, binnen 12 Stunden geschlüpft waren und bis zum Zuchtbeginn keine

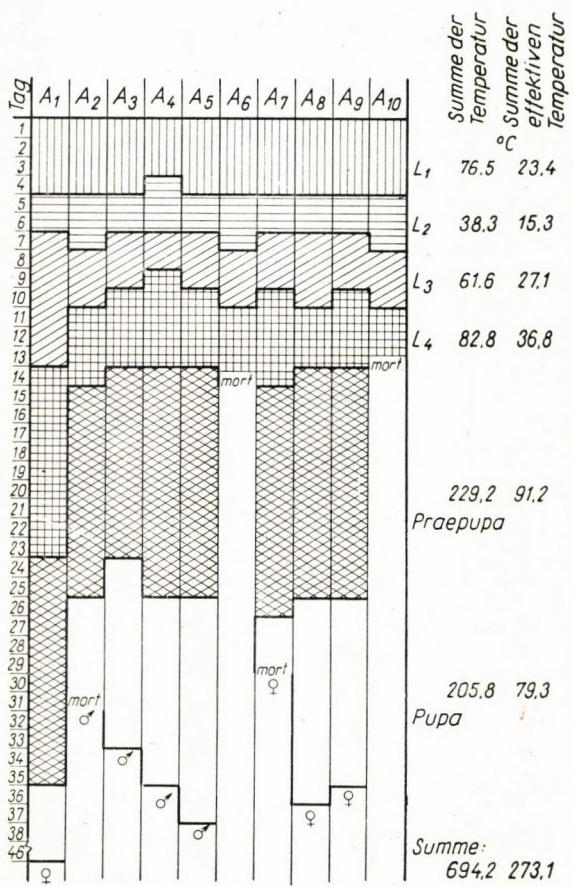


Abb. 9. Entwicklungsdauer von 10 Larven (A<sub>1</sub>—A<sub>10</sub>) auf den Blättern von *Brassica napus* f. *biennis* in Einzelzuchten

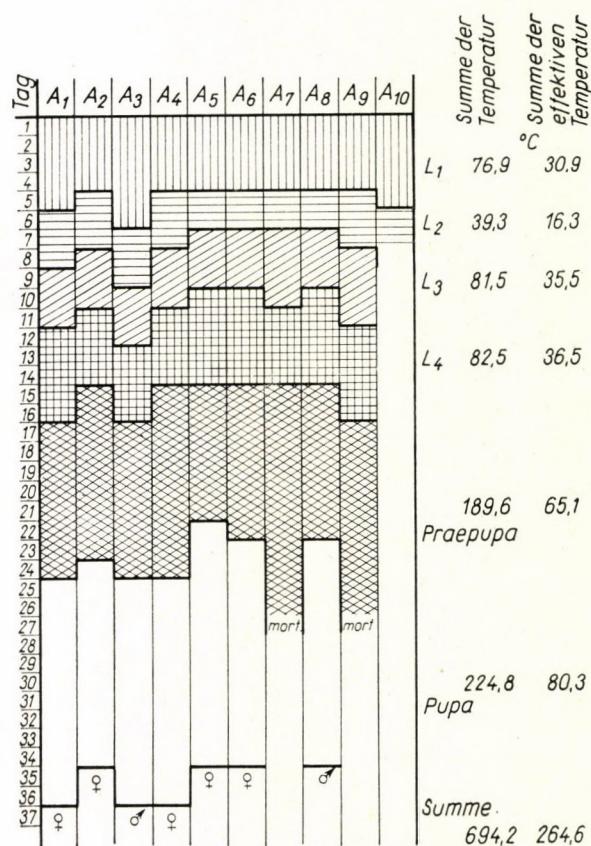


Abb. 10. Entwicklungsdauer von 10 Larven (A<sub>1</sub>—A<sub>10</sub>) auf den Blättern von *Sinapis arvensis* in Einzelzuchten

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ÖKOLOGIE DES SENFKÄfers

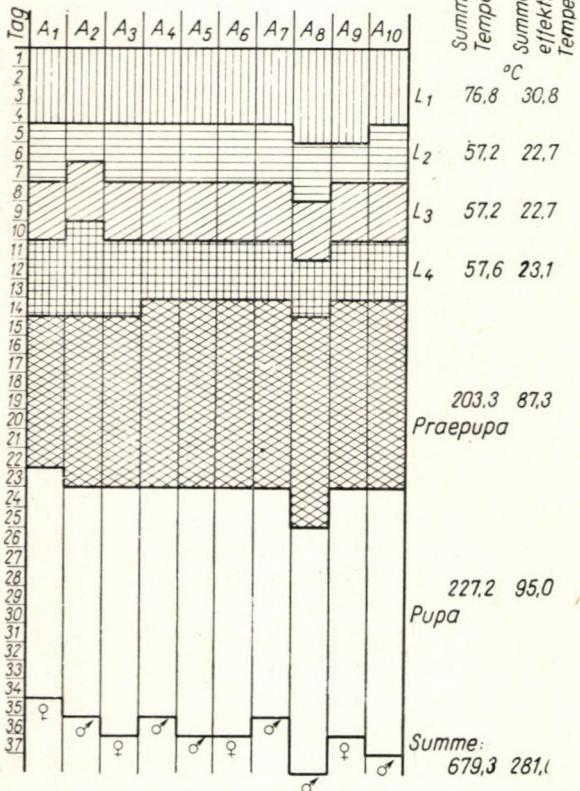


Abb. 11. Entwicklungsdauer von 10 Larven (A<sub>1</sub>—A<sub>10</sub>) auf den Blättern von *Lepidium draba* in Einzelzuchten

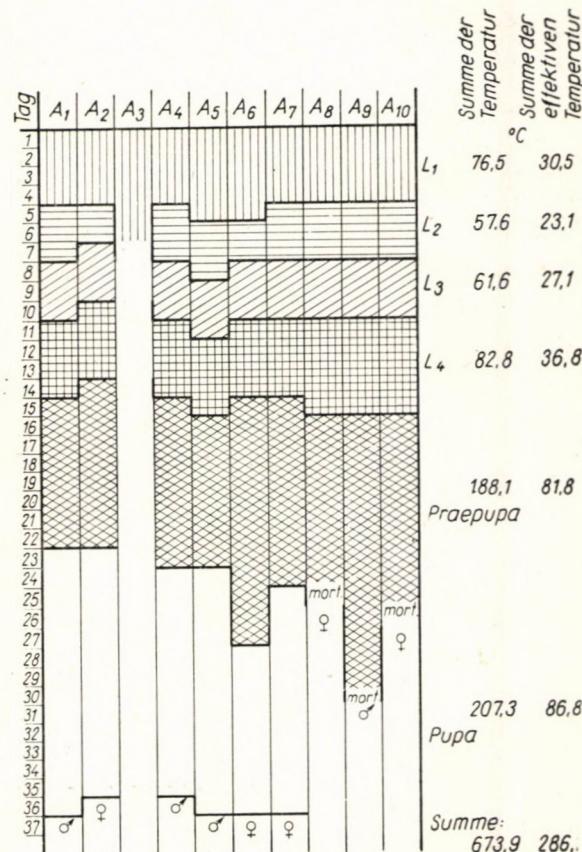


Abb. 12. Entwicklungsdauer von 10 Larven (A<sub>1</sub>—A<sub>10</sub>) auf den Blättern von *Capsella bursa-pastoris* in Einzelzuchten.

Nahrung erhielten. Von allen 5 Pflanzenarten erhielten die Larven in jedem Falle die jüngsten Blätter. Diese Nahrung wurde täglich und beinahe zur selben Zeit (zwischen 13 und 15 Uhr) gewechselt. Bei dieser Gelegenheit erfolgte — durch Einsammeln der abgeworfenen Kopfkapseln — auch die Ermittlung des Entwicklungsgrades der Larven. Die L<sub>1</sub>-Larven wurden mit einem Pinsel, die älteren mit Leonhart-Pinzelten auf die frische Nährpflanze übertragen. Die Einzelzuchten umfaßten je Pflanze 10 Larven, welche zur Bestimmung des Entwicklungsgrades dienten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind auf den Abb. 8 bis 12 dargestellt. In vertikaler Richtung wurden die Tage, in horizontaler die Zahl der Einzelzuchten (A<sub>1</sub>—A<sub>10</sub>) aufgetragen.



Abb. 13. Ein zur Larvenzucht gebrauchter Hygrostat

Eine Analyse des auf den einzelnen Pflanzen stattgefundenen Entwicklungsganges erübrigt sich, anstelle dieser geben die Abbildungen den nötigen Aufschluß.

Überblickt man die in den Einzelzuchten wahrgenommenen Entwicklungszeiten, so stellt es sich heraus, daß diesbezüglich auf den untersuchten 5 Pflanzenarten keine wesentlichen Unterschiede zu verzeichnen waren. Die in Erscheinung tretenden kleineren oder größeren Differenzen können ebenso gut der verschiedenen Pflanzen wie auch individuellen Eigenschaften zugeschrieben werden. Individuelle Entwicklungen sind schon innerhalb zur gleichen Zeit entstandenen Eigelegen vorhanden und werden durch Unterschiede in der embryonalen Entwicklungszeit verursacht.

Nach RITZEMA BOS [12] beansprucht die Larvenentwicklung »etwa einen Monat«. SACHAROW [16] gibt die Dauer der ganzen Larvenentwicklung mit 18 bis 21 Tagen an. In den Versuchen von MÜLLER [10] benötigten die L<sub>1</sub>-Larven 2 bis 3, die im L<sub>2</sub>-Stadium 2, im L<sub>3</sub> 3 bis 4 und im L<sub>4</sub>-Stadium 16 bis 18 Tage dazu. Die ganze Larvenentwicklung dauerte 24 bis 26 Tage; von dieser

Zeit wurden 12 bis 13 Tage, also die Hälfte der Entwicklungsdauer für Nahrungsaufnahme verwendet. Bei diesen Versuchen schwankte die Temperatur zwischen 17,8 und 25,0° C.

Auf den Abbildungen 8 bis 12 sind die unterhalb der einzelnen Entwicklungsstadien verzeichneten Werte der Wärmesumme und effektiven Temperatur in Celsius-Graden angegeben. Sowohl die Wärmesumme als auch die effektive Temperatur wurden bis zum Zeitpunkt berechnet, bei dem 50 vH der Tiere die Umwandlung durchschritten hatten.

### Entwicklungsgeschwindigkeit der Larven auf verschiedenen Wirtspflanzen

Es wurde schon besprochen [p. 113—115], daß die im Frühjahr auf der Bodenoberfläche erschienenen Imagines zwecks der Nahrungsaufnahme die zu den Kreuzblütlern gehörenden häufigeren Unkräuter des Ackerlandes aufsuchen. Es wurden mehrmals auch Eigelege in der Nähe der Wirtspflanzen zwischen den Bodenkrumen gefunden. Aus dieser Beobachtung ausgehend ist die Entwicklungsgeschwindigkeit der Larven auf diesen Unkrautgewächsen — im Vergleich zu jener, die auf dem Weißen Senf zu verzeichnen war — untersucht worden, um festzustellen, welche Unterschiede in der Entwicklungsdauer bei den auf den einzelnen Wirtspflanzen gezogenen Larven in Erscheinung treten.

Bei den Untersuchungen dienten Hygrostate als Behelfsmittel. Auf jeder Pflanze wurden 50, in jedem Hygrostat 10 Larven gezogen. Dieses Material entstammte einer Massenzucht, die Larven wurden unmittelbar nach dem Schlüpfen, also noch vor Beginn der Nahrungsaufnahme auf die Hygrostate gesetzt. Die als Kontrolle benutzten Pflanzen des Weißen Senfs lieferte ein Freilandzuchtgarten, in diesem wuchsen auch die Unkräuter wild auf. Im Laufe ihrer Entwicklung erhielten die Larven jeden Tag frische Nahrung; bei dieser Gelegenheit wurde auch ihr Entwicklungsstadium und alle 5 bis 6 Tage ihr Gewicht ermittelt. Die Gewichtsangaben sollten darüber Aufschluß geben, ob zwischen der Entwicklungsgeschwindigkeit und den Änderungen des Larvengewichtes irgendein Zusammenhang besteht und ob dieser kennzeichnend für die untersuchte Pflanzenart ist.

Da die Untersuchungen mit den ausgewählten 4 Pflanzenarten nicht zu gleicher Zeit angestellt werden konnten, weil die hierfür nötige große Menge an jungen Larven nicht zu beschaffen war, mußte mit jeder Zucht auch eine separate Kontrollzucht eingesetzt werden. Zu diesen Untersuchungen haben sowohl von den angebauten Senfpflanzen wie auch von den Unkräutern immer die jüngsten Blätter die Nahrung für die Larven geliefert. Die Untersuchung umfaßte folgende Pflanzenarten: *Sinapis alba* L. (als Kontrollpflanze), *Brassica napus* L. f. *biennis* Thell., *Lepidium draba* L., *Sinapis arvensis* L., *Capsella bursa-pastoris*. Die Arbeiten wurden in einem Glashaus von wechselnder Temperatur durchgeführt, deren Durchschnittswert 20,2° C betrug und sich aus bis zu 25,0° C steigenden Maxima und bis zu 16,8° C sinkenden Minima ergab.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Abb. 14 bis 17 veranschaulicht. Neben jeder zur Prüfung herangezogenen Pflanzenart sind gesondert die auf *Sinapis alba* als Kontrollpflanze festgestellten Werte des Entwicklungsganges und Larvengewichtes dargestellt; letztere sollten die mit der

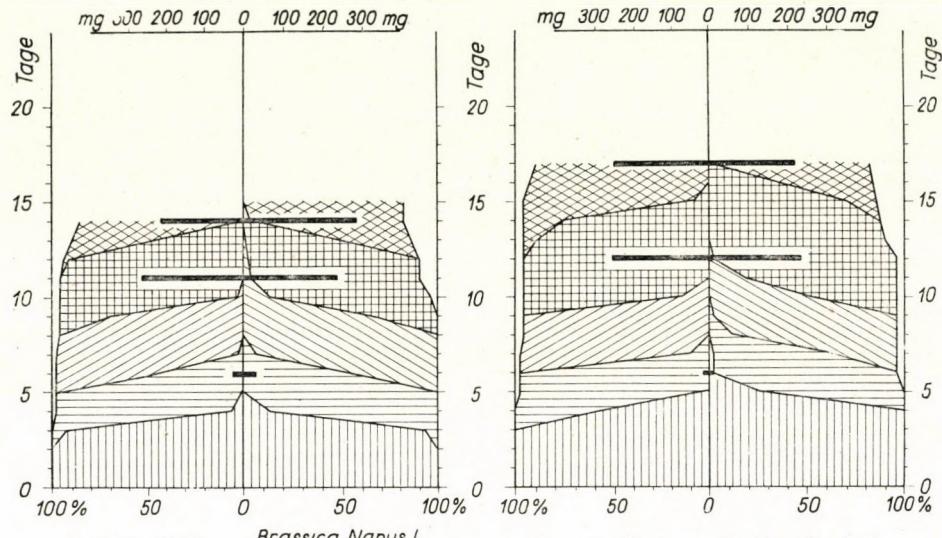


Abb. 14

Abb. 15

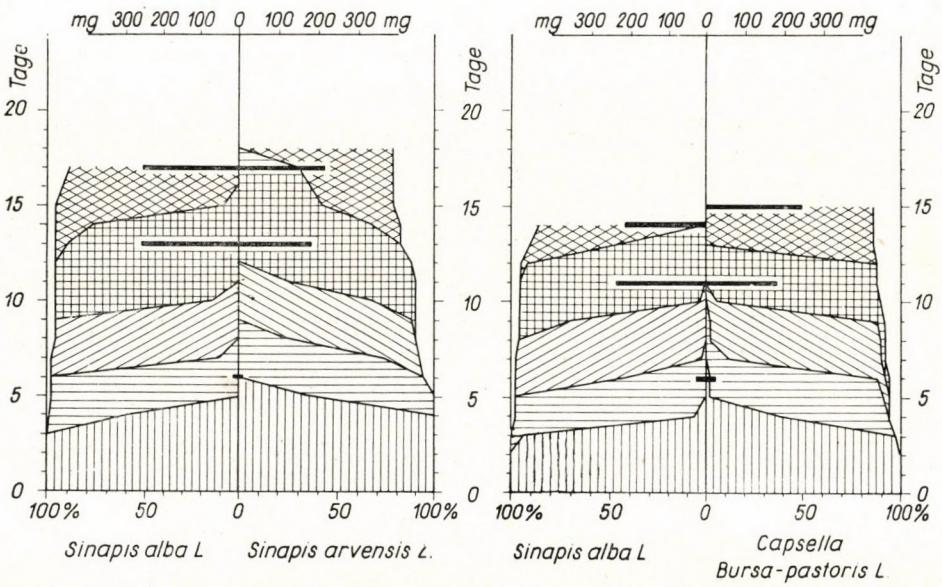


Abb. 16

Abb. 17

- Abb. 14. Verlauf der Larvenentwicklungsgeschwindigkeit auf den Blättern von *Sinapis alba* und *Brassica napus f. biennis*. — = Durchschnittsgewicht von 10 Larven (mg)
- Abb. 15. Verlauf der Larvenentwicklungsgeschwindigkeit auf den Blättern von *Sinapis alba* und *Lepidium draba*. — = Durchschnittsgewicht von 10 Larven (mg)
- Abb. 16. Verlauf der Larvenentwicklungsgeschwindigkeit auf den Blättern von *Sinapis alba* und *Sinapis arvensis*. — = Durchschnittsgewicht von 10 Larven (mg)
- Abb. 17. Verlauf der Larvenentwicklungsgeschwindigkeit auf den Blättern von *Sinapis alba* und *Capsella bursa-pastoris*. — = Durchschnittsgewicht von 10 Larven (mg)

Entwicklungs dauer zusammenhängenden Gewichtsänderungen beleuchten. Auf den Abbildungen sind unten in seitlicher Richtung die prozentualen Anteile der Entwicklungsstadien, nach aufwärts die Tage und oben, nach der Seite die Larvenkör per gewichte in mg aufgezeigt. Die schwarzen, horizontal verlaufenden, dicken Striche bedeuten in jedem Falle das Durchschnittsgewicht von je 10 Larven. In der Entwicklungs dauer der L<sub>4</sub>-Larven ist auch das Vorpuppen stadium mit inbegriffen.

Vergleicht man auf Grund der Abbildungen die Dauer der einzelnen Entwicklungsstadien, die Mortalität sowie das Gewicht von 10 Larven, also diejenigen Faktoren, die zur Kennzeichnung der Geschwindigkeit der Larvenentwicklung am meisten geeignet sind, so kommen wir zu folgenden Feststellungen.

*Sinapis alba* — *Brassica napus f. biennis* (Abb. 14). Hinsichtlich der Larvenentwicklung besteht zwischen diesen zwei Pflanzenarten keine Differenz. Auf beiden verpuppten sich 50 vH der Larven nach 14 Tagen. Ihre Mortalität war auf dem Raps höher als auf dem Weißen Senf. Während aber auf letzterem das Absterben der Larven schon im L<sub>2</sub>-Stadium begann, trat dies auf dem Raps nur bei den L<sub>4</sub>-Larven ein, erreichte aber in kurzer Zeit höhere Werte. Ein Vergleich von Gewicht und Entwicklungs dauer der Larven zeigt keinen eindeutigen Zusammenhang. Auf Senf wogen die Larven am 6. Tag weniger als die auf Raps, am 11. Tag trat jedoch — im Verhältnis zum letzteren — am Senf eine wesentliche Erhöhung des Larvengewichtes ein. Am 14. Tag zeigten wiederum die auf Raps gezogenen Larven ein höheres Gewicht. Die in den Gewichtsverhältnissen eingetretenen Unterschiede sind nicht von so großer Bedeutung, daß diese die günstigere Wirkung der einen oder anderen Nährpflanze beweisen könnten.

*Sinapis alba* — *Lepidium draba* (Abb. 15). Wenn auch in der Dauer der einzelnen Entwicklungsstadien keine größeren Abweichungen zu verzeichnen sind, so zeigt sich bei der Pfeilkresse immerhin eine gewisse Verschiebung, die schon im L<sub>1</sub>-Stadium beginnt und während der ganzen Larvenentwicklung anhält. Doch nicht bloß die Dauer der Larvenentwicklung verzögert sich auf *Lepidium*, sondern auch die Mortalität liegt etwa um 8 vH höher. Das größte Absterben trat bei den L<sub>4</sub>-Larven und im Puppenstadium ein. Das Gewicht der auf Senf gezogenen Larven war bei den letzten zwei Messungen höher, bei der ersten Ermittlung stellten sich die Angaben für beide Pflanzen gleich.

*Sinapis alba* — *Sinapis arvensis* (Abb. 16). Die Larvenentwicklung ging auf dem Ackersenf (*Sinapis arvensis*) langsamer als auf dem Weißen Senf vor sich. Die Ursache der Verschiebung ist in der länger dauernden Entwicklung des L<sub>1</sub>-Stadiums zu suchen. Es kann angenommen werden, daß *S. arvensis* für die L<sub>1</sub>-Larven eine ungünstige Wirtspflanze ist, und deshalb die Nahrungsaufnahme nur nach einer länger währenden Kostprobe beginnen konnte. Die Mortalität der Larven ist auf dem Ackersenf wesentlich höher als auf *S. alba*.

An der ersteren Pflanze betrug sie während des Versuches 22, an der letzteren blos 10 vH. Das Gewicht der Larven, die sich von den Blättern des Weißen Senfs ernährten, war bei allen drei Messungen eindeutig höher als das der mit Ackersenf gefütterten; dies beweist den günstigeren Nährpflanzencharakter des Weißen Senfs.

*Sinapis alba* — *Capsella bursa-pastoris* (Abb. 17). Hinsichtlich der Larvenentwicklungs dauer besteht zwischen den zwei Pflanzenarten kein wesentlicher Unterschied. Am Ende des Versuchs zeigte sich im Mortalitätsprozent keine Differenz, das am 11. Tag ermittelte Larvengewicht war jedoch bei den am Weißen Senf gehaltenen Tieren entschieden größer. Die im Larvenstadium festgestellten Gewichte können nicht verglichen werden, da einerseits die Messungen nicht am selben Tag vorgenommen wurden und anderseits das Gewicht der ihre Fraßtätigkeit beendeten Larven bis zur Verpuppung abnimmt. Weil aber die Verpuppung nicht zu gleicher Zeit stattfand, zeigten die Änderungen der Gewichtsverhältnisse keinen verlässlichen Zusammenhang.

Vergleicht man die Ergebnisse der auf verschiedenen Wirtspflanzen durchgeführten Untersuchungen, so stellt es sich heraus, daß alle 5 Pflanzenarten für die Ernährung der Larven geeignet sind. In der Geschwindigkeit der Larvenentwicklung zeigte sich kein wesentlicher Unterschied. Die Larvenmortalität erreichte auf den untersuchten Pflanzenarten — mit den auf Weißem Senf gefundenen Werten verglichen — in allen Fällen einen höheren Prozentsatz. Während des Larvenstadiums stieg die Mortalität auffallend an; die Ursache hierfür ist nicht nur in den Wirtspflanzen, sondern auch in der unter naturwidrigen Bedingungen erfolgten Haltung der Larven zu suchen.

Die während der Zeit der Larvenentwicklung gemessenen Gewichtsänderungen scheinen eine entsprechende Basis zur Beurteilung der »Güte« der Wirtspflanzen zu sein. Aber nur bei den ausgewachsenen, Nahrung aufnehmenden Larven ( $L_{4b, c}$ ), weil vor der Verpuppung und im Puppenstadium, zufolge der aussetzenden Nahrungsaufnahme, ein hochgradiger Gewichtsrückgang erfolgt [21], der die Möglichkeit einer richtigen Folgerung beeinträchtigt. Wie die Untersuchungen zeigten, besteht bei den geprüften Pflanzenarten im Verlauf der Entwicklungsgeschwindigkeit ein Unterschied von bloß 1 bis 2 Tagen, demgegenüber erreichten aber die Larven — nach den Angaben der Gewichtsverhältnisse — auf dem Weißen Senf immer ein höheres Gewicht, d. h. von dieser Pflanze ist — bei gleicher Entwicklungsgeschwindigkeit — die Nahrungsaufnahme größer. Dadurch wird auch die höhere durchschnittliche Eierproduktion der Imagines, die aus auf Weißem Senf lebenden Larven hervorgegangen sind, erklärliech [p. 115—116]. Mit anderen Worten: der Weiße Senf übt — den anderen Wirtspflanzen gegenüber — eine lebensfähigkeitsteigernde Wirkung aus.

Diese Untersuchungen ließen jene Fähigkeit der Larven außer acht, daß sie zwischen den Wirtspflanzen selbst ihre Wahl treffen können, denn im

Hygrostat stand ihnen immer nur eine Pflanzenart zur Verfügung. Die gewonnenen Ergebnisse sagen also nichts über die Rangordnung aus, nach welcher die Wirtspflanzen von den Larven bevorzugt werden. Diese Frage wurde im Laufe der auf die Nährpflanzenwahl gerichteten Untersuchungen studiert.

### Die Wirtspflanzenwahl der Larven

Das Frühjahrsvorkommen der Vollkerfe auf den häufigsten Kultur- und Unkrautpflanzenarten der Kreuzblütler rief den Gedanken wach, mit exakten Laboruntersuchungen festzustellen, welche Gewächse und in welchem Grade geeignet sind, als Nahrung für die die Hauptschädlingsform bedeutende Larve zu dienen. Die Klärung der Rolle der Wirtspflanzen erschien schon deshalb wichtig, da es sich um einen in Ungarn bislang nicht bekannten Schädling handelte und weil der Literatur zu entnehmen war, daß in den verschiedenen Ländern seines Auftretens immer andere Gewächse als primäre Nährpflanzen erwähnt werden [20]. Schon die orientierenden Untersuchungen erbrachten den Beweis [19], daß von den auf Ackerland angebauten Kultursorten der Kreuzblütler *Sinapis alba* von dieser Käferart bevorzugt wird. Deshalb wurden die Kultur- und Unkrautpflanzen im Beisein von Weißem Senf untersucht, und die so erhaltenen Werte auf die am Senf gewonnenen bezogen.

Als Untersuchungsmethode wurde der von LANGENBUCH [6] eingeführte »Sandwich-Test« gewählt, den JERMY [4] den ungarländischen Bedingungen entsprechend modifizierte. Diese beiden Forscher stellten ihre Untersuchungen mit Larven des Kartoffelkäfers an. Da die Larven von *Colaphellus sophiae* in der Nahrungsaufnahme den Kartoffelkäferlarven gleichen, erschien die Anwendung dieser Methode geeignet zu sein. Hierbei wird folgender Weg beschritten. Aus Blättern der zu untersuchenden Pflanzen schneidet man mit einem gewöhnlichen Plätzchenstecher Scheiben von 16 mm Durchmesser heraus. Diese Scheiben werden dann mittels Stecknadeln in einer 12 cm breiten Butterschale, deren Boden mit Wellpapier bedeckt ist, am Rande eines Kreises von 6,5 cm Durchmesser derart befestigt, daß man die Stecknadeln in die Wellpappe sticht. Von jeder Pflanze kamen 6—6 Scheiben in ein Zuchtgefäß. Ihre Entfernung von der Welpappe betrug etwa 3 bis 5 cm, demzufolge konnten die Larven die Nahrung von unten und von allen Seiten leicht erreichen. Die horizontale Lage der mit der Stecknadel durchstochenen Blattscheibe wird durch je ein, ober- und unterhalb dieser angebrachtes, 2 × 2 mm großes Korkstückchen gesichert. Um ein infolge Austrocknung eintretendes Zusammenrollen der Blattscheiben während der Beobachtungszeit zu verhindern, wurden je Zuchtgefäß etwa 2 ccm Wasser auf die Wellpappe gegossen; nachher wurde die Butterschale mit einer anderen, die denselben Durchmesser hatte, bedeckt. Diese Vorkehrung bewirkte, daß die Nahrungsaufnahme der Tiere im Zuchtgefäß immer bei 100%iger Luftfeuchtigkeit erfolgte. Die Zuchtgefäße wurden im Gewächshauslabor auf den mittleren Tisch gesetzt, so daß sie von allen Richtungen gleichmäßig Licht erhielten. Dies ist eine wichtige Forderung, denn falls auf der einen Seite des Zuchtgefäßes die Beleuchtung stärker einwirkt, so verzehren die Larven von den hier untergebrachten Blattscheiben mehr als von den im geringeren Lichtgenuß stehenden. In jedes Zuchtgefäß wurden L<sub>4a</sub>- oder L<sub>3a,b</sub>-Larven, die vorher 10 bzw. 24 Stunden hungrig mußten, gesetzt. Das Ausmaß der Nahrungsaufnahme von den Sandwiches wurde durch Schätzung festgestellt. Die vollständige Verzehrung eines Sandwiches erhielt die Bewertung 1,00, blieb sie unberüht, wurde die Ziffer 0 notiert. Alle Schätzungen hatte ein und dieselbe Person vorgenommen, der individuelle Fehler blieb also konstant. Die Ermittlungen erfolgten anfangs ständig, später alle 6, 18 und 24 Stunden. Alle Untersuchungen wurden in drei Serien mit je 10 Larven durchgeführt. Die verglichenen Angaben der mit den einzelnen Pflanzenarten angestellten Versuche stammen aus jener Zeit der Aufnahme, als die Larven bereits 50 bis 70 vH der Sandwiches verzehrt hatten. Ein Vergleich von höheren Graden der Nahrungsaufnahme erschien nicht zweckmäßig, denn sobald die Lar-

ven die bevorzugten Sandwiches verzehrten, wandten sie sich in ihrem Hunger auch den aus weniger wohlschmeckenden Wirtspflanzen gebotenen Sandwiches zu, und vertilgten auch diese. Deshalb ist der Versuch nach einer gewissen Zeit zum Vergleich der zwei Pflanzenarten nicht mehr geeignet. Solange aber von beiden Pflanzen eine genügende Fläche zur Verfügung steht, ist auch die Möglichkeit für die Nahrungswahl gegeben.

Die Versuche erstreckten sich auf folgende Pflanzenarten:

- A) *Sinapis alba* L.
- B) *Brassica napus* L: f. *biennis* THELL.
- C) *Lepidium draba* L.
- D) *Sinapis arvensis* L.
- E) *Capsella bursa-pastoris* L.

Von den zahlreichen Untersuchungen ist hier — in Tabelle 4 — nur das zusammengefaßte Endergebnis angeführt.

Diese 5 Arten kamen in allen möglichen Kombinationen paarweise zur Anwendung (A—B, A—C, A—D, A—E, B—D, B—C, B—E, C—D, C—E, E—D).

**Tabelle 4**  
*Ergebnisse der Untersuchungen über die Nahrungswahl*

Untersuchte Pflanzen	Verzehrte Blattmenge in Prozenten der Nahrungsaufnahme aus den Blättern des Weißen Senfs		
	M	±	m
Weißer Senf ( <i>Sinapis alba</i> L.) .....	100	—	—
Raps ( <i>Brassica napus</i> L. f. <i>biennis</i> Thell.) .....	86,5	±	3,7
Ackersenf ( <i>Sinapis arvensis</i> L.) .....	78,0	±	6,5
Pfeilkresse ( <i>Lepidium draba</i> L.) .....	74,5	±	2,1
Hirntäschel ( <i>Capsella bursa-pastoris</i> L.) .....	60,3	±	4,5

Die Nahrungsaufnahme vom Weißen Senf wurde mit 100 beziffert, die in Tabelle 4 aufgezeigten Werte stellen die Ergebnisse der Untersuchungen dar. Die Größenordnung der Werte drückt zugleich die Stufenfolge der Wirtspflanzen aus. Die Untersuchungen erbrachten den Beweis, daß der Senfkäfer ein oligophages Tier ist. Mit seiner Schadwirkung muß man also auch dort rechnen, wo bisher Senf nicht angebaut wurde, da dieses Tier (zufolge der Häufigkeit seiner Wirtspflanzen) — wenn auch mit geringerer Population — überall vorkommen kann. So wird es möglich, daß der Käfer in Senfschlägen, die ihm die bevorzugten Wirtspflanzen bieten, sich massenhaft vermehrt und dadurch wirtschaftlicher Schaden entsteht.

Da im Zuge der Untersuchungen die Larven den Weißen Senf allen anderen Pflanzenarten gegenüber vorzogen, und auch mit Vollkerfen im Freiland ähnliche Beobachtungen gemacht wurden, erhielt dieses Insekt die Bezeichnung »Senfkäfer«.

Für die primäre Wirtspflanzenrolle des Weißen Senfs zeugt auch folgende Beobachtung. In einer Versuchsserie wurden die Larven vom Schlüpfen bis zu ihrer Einstellung in die Zuchten auf Ackersenf, Hirtentäschel und Raps gehalten und nachher in solche Sandwichzuchten gebracht, die Weißen Senf und außerdem die im Larvenstadium verabreichte Pflanze enthielten. Die Larven hatten in jedem Falle dem Weißen Senf den Vorzug gegeben. Dieser Versuch beweist, daß man die Tiere während der Larvenentwicklung einer Generation nicht von ihrer primären Nährpflanze abringen kann.

### Die Wirtspflanzen der Larven und Imagines

Als Nährpflanzen des Senfkäfers und seiner Larve dienen jene häufigen Unkraut- und Kulturgewächse, die zur Familie der Kreuzblütler (Cruciferae) gehören. In der Literatur wurden folgende Wirtspflanzen erwähnt:

#### Unkräuter

*Sisymbrium sophia* L. [10, 11, 12, 13].

*Raphanus raphanistrum* L. [11, 12, 13].

*Sinapis arvensis* L. [12, 13].

*Barbarea vulgaris* L. Br. [12, 13].

*Raphanus sativus* L. [10, 14].

*Sisymbrium altissimum* L., *S. loeselii* Jusl., *Erysium cheiranthoides* L., *Lepidium sativum* L.

*L. ruderale* L., *Arabis avenosa* Scop. und *Armoracia rusticana* G. M. Sch. (= *lapathifolia* Gilib.) [10].

Ohne Angabe der botanischen Bezeichnung werden die Kressearten (winter cress) angeführt [16].

#### Kulturpflanzen

*Sinapis alba* L. [5, 12, 13].

*Brassica nigra* (L.) Koch und *Br. rapa* L. [12].

*Brassica oleracea* L. [5, 9, 10, 12].

*Brassica napus* L. [8, 10, 14].

Ohne den wissenschaftlichen Namen anzugeben, erwähnt die Literatur noch folgende Nährpflanzen:

Senf [1, 15, 17, 23].

Raps [2].

Kraut [7, 9, 14, 16].

Radieschen [9].

Während der letzten 3 Jahre konnten in Keszthely und Umgebung Larven und Vollkerfe bei ihrer Nahrungsaufnahme an folgenden Unkräutern und Kulturpflanzen beobachtet werden: *Capsella bursa-pastoris* L., *Lepidium draba* L., *Sinapis arvensis* L., *Raphanus raphanistrum* L. (Unkräuter) und *Sinapis alba* L., *Brassica napus* L. f. *annua* THELL. et f. *biennis* THELL. sowie *Raphanus sativus* L. sf. *ruber* SCHIMP. et SPEN. (Kulturpflanzen).

### Ruhezustand (Diapause) der Imagines

Unter natürlichen Bedingungen verbleibt ein Teil der Senfkäfer nach der Umwandlung zum Vollkerf (dies tritt gewöhnlich im Juni oder Juli ein) im Boden bis zum nächsten Frühjahr; 2 bis 5% der Imagines wandern im September auf die Oberfläche, verziehen sich aber nach kurzer Nahrungsaufnahme wieder in den Boden zur Überwinterung. Der dritte Teil kommt

nur nach nochmaliger Überwinterung zum Vorschein. In einer Zucht, die 25 Larven zählte, verzog sich die letzte Larve am 8. Juli 1957 in den Boden. Das Zuchtgefäß wurde im Herbst in ein dem Freiland anvertrauten Überwinterungshäuschen gesetzt. Im Frühjahr 1958 kamen 14 Imagines an die Oberfläche. Von den im Boden verbliebenen 11 Vollkerfen krochen 5 Exemplare zwischen dem 21. März und 16. April 1959 hervor, 6 Imagines ruhten aber bei dem am 27. Mai 1959 vorgenommenen Durchsieben des Bodens noch in Diapause. Nach den bisherigen Versuchen kann also der Ruhezustand bei einem Teil der Vollkerfe 8 bis 10, bei anderen Exemplaren 20 bis 25 Monate dauern. In einer anderen Zucht kamen 2 bis 5 vH der Imagines gegen Ende September an die Oberfläche, verzogen sich jedoch nach kurzer Fraßtätigkeit zur Überwinterung wieder in den Boden. Bei Freilandfängen mit dem Kätscher wurden im September ebenfalls Vollkerfe gesammelt.

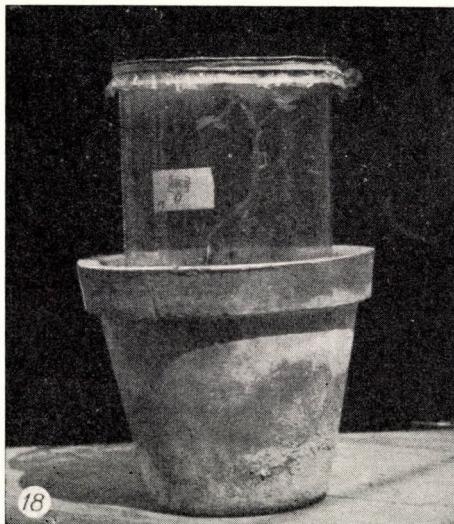


Abb. 18. Das für Laborzuchten verwandte Zuchtgefäß

MÜLLER [10] berichtet darüber, daß nach einigen Autoren (die Namen sind nicht angegeben) verläßt ein Teil der jungen Imagines schon im Alter von 2 Tagen die Kammer und bohrt sich tiefer in den Boden, ein anderer Teil kommt auf die Erdoberfläche und kriecht dort wochenlang umher. Er ist der Ansicht, daß nur ein sehr geringer Prozentsatz der Käfer an der Oberfläche erscheint. Nach den in Holland gemachten Beobachtungen von RITZEMA BOS [12] kommen die jungen Käfer auf die Oberfläche, nehmen Nahrung zu sich und verziehen sich zur Überwinterung wieder in den Boden. MÜLLER [10] setzte am 6. September 1946 an der Oberfläche erschienene Käfer in den Boden eines mit Erde gefüllten Blumentopfes, wo sie überwinterten. Nach seinen Angaben nehmen die Ende Sommer zum Vorschein gekommenen Käfer keine Nahrung zu sich und kopulieren auch nicht.

Es wurde untersucht, ob eine tatsächliche Diapause besteht und wie lange — im Falle einer solchen — dieser Ruhezustand dauert, oder ob wir es mit einer nur unter ungünstigen Verhältnissen zustandegekommenen Diapause zu tun haben. Für diesen Zweck wurden von den im Boden zu Vollkerfen umgewandelten Tieren alle 30 Tage 15 Männchen und 10 Weibchen ausgesiebt und in Zuchtgefäße ins Gewächshauslabor gesetzt (Abb. 18), wo sie täglich frische Blätter des Weißen Senfs erhielten. Die erste Siebung erfolgte am 2. August 1958, bei dieser kamen die Ende Juni geschlüpften Imagines in die Zuchten. In die zweite Zuchtserie wurden die am 2. September dem Boden entnommenen, also schon seit 60 Tagen in Diapause befindlichen Tiere gesetzt. In die dritte Zuchtserie gelangten die am 2. Oktober ausgehobenen Imagines, die also eine drei Monate dauernde Ruhepause im Boden hinter sich hatten. Die nächsten Zeitpunkte des Zuchtbeginns fielen auf die Tage zwischen dem 15. und 20. Oktober, nachher auf die erste Novemberwoche, wobei also seit  $3\frac{1}{2}$  bis 4 Monaten diapausierende Ima-

gines in die Zuchten gelangten. Alle Tiere dieser Zuchten erhielten täglich frische Senfblätter, gleichzeitig wurde ihr Verhalten (intensive Bewegung, Beginn der Nahrungsaufnahme, Kopulation und Eiablage) vermerkt. Wie die Beobachtungen zeigten, haben nach 1 bis 1 1/2 Wochen diejenigen Vollkerfe die Nahrungsaufnahme, Paarung und Eiablage begonnen, die am 2. Oktober und in der darauffolgenden Zeit ausgehoben wurden. Die nach einer 1 und 2 Monate währenden Diapause der Zucht zugeführten Imagines haben selbst unter der Einwirkung von günstigen Bedingungen (frische Nahrung, Temperatur über 20° C) nach 1 bis 2 Wochen ihre Lebensfunktionen nicht begonnen, sondern verblieben auch weiterhin im Ruhezustand. Dies äußerte sich darin, daß sie sich schleppend zwischen die Bodenkrümen zurückzogen und dort kauerten. Zu bewegen schickten sie sich erst nach 2 1/2 bis 3 Monaten an, nachher begann von neuem ihre Nahrungsaufnahme und bald darauf die Eiablage. Daß im Verhalten der unter nahezu gleichen Bedingungen gehaltenen Tiere solche große Unterschiede zu verzeichnen waren, ist der Beweis dafür, daß die Diapause auch bei günstigen Umweltbedingungen nur nach einer Periode von 3 bis 3 1/2 Monaten abgebrochen werden könnte.

Die Notwendigkeit einer Ruhepause nach der Umwandlung zum Vollkerf wird durch die Beobachtung bewiesen, wonach frisch gehäutete, noch nicht ganz ausgefärbte Imagines selbst bei hoher Temperatur (über 25° C), langer Photoperiode (20 Stunden währender Beleuchtung) und frischer Nahrung sich in den Boden verzogen.

Diese Untersuchungen geben gleichzeitig die theoretische Erklärung für jene von MÜLLER [10] und dem Verfasser gemachte Beobachtung, daß ein kleiner Prozentsatz der Käfer Ende Sommer auf die Oberfläche kommt, und sich dann wieder in den Boden verzieht. Wie die Versuche erwiesen, haben die im Boden befindlichen Imagines bis September die 3 Monate anhaltende Diapause schon durchgemacht, d. h. in ihrem Organismus waren bis dahin jene physiologischen Umwandlungen abgelaufen, die für den neuerlichen Beginn ihrer Lebensfunktionen notwendig sind. Daß trotzdem nicht alle Vollkerfe im Spätsommer auf die Oberfläche kommen, ist vielleicht eine im Laufe der Phylogenetese erworbene Eigenschaft, die sicherlich mit der Erhaltung der Art in enger Verbindung steht. Eine ähnliche Erscheinung konnte auch bei *Baris coerulescens* beobachtet werden: 8 bis 15 vH der überwinternden Imagines kommen im Herbst (Oktober—November) auf die Oberfläche, nehmen für kurze Zeit Nahrung zu sich, legen aber keine Eier, sondern kriechen in den Boden zurück, um dort zu überwintern.

Der Versuch erbrachte somit den Beweis, daß der Ruhezustand des Senfkäfers eine wirkliche Diapause ist, da man diese nicht einmal unter dem Einfluß von günstigen Umweltbedingungen aufheben kann. Die Imagines müssen also 3 bis 3 1/2 Monate in Diapause verbleiben, um ihre Lebenstätigkeit beginnen zu können.

### Phänologie des Senfkäfers

Der Senfkäfer bringt in Ungarn jährlich eine Generation hervor. Nach RITZEMA Bos [12] entwickelt er in Holland, nach MÜLLER [10] in Deutschland ebenfalls nur eine Generation.

Die Angaben, die auf Grund der im Jahre 1957 halbwegs und gänzlich unter Freilandbedingungen durchgeführten Versuche über das jahreszeitliche Vorkommen der Entwicklungsformen erhalten wurden, sind in Abb. 19 aufgezeigt. Nach den seit 1956 geführten systematischen Beobachtungen und Untersuchungen können die im Boden überwinternden Imagines ab Mitte März auf der Oberfläche erscheinen. In größter Menge sind sie in der zweiten Maihälfte vorzufinden, von dieser Zeit an nimmt ihre Zahl — zufolge der natürlichen Mortalität — stufenweise ab. Ende Sommer, in den Monaten August und September können wieder 1 bis 2 junge Vollkerfe eingesammelt werden, doch diese sind — wie es die Untersuchungen bewiesen haben — bereits überwinternde Imagines. Solche Exemplare legen unter natürlichen Bedingungen in Ungarn keine Eier, deshalb kann nicht einmal eine partielle zweite Genera-

tion entstehen. Nach den im Labor und unter Halbfreilandbedingungen durchgeführten Untersuchungen stehen vorläufig keine Beweise darüber zur Verfügung, daß die einmal überwinternten Vollkerfe nach ihrer zu Beginn des Frühjahrs bzw. im Frühsommer ausgeübten Tätigkeit (Nahrungsaufnahme, Kopulation, Eiablage usw.) sich wieder in den Boden verziehen und überwintern. Es konnte jedoch festgestellt werden, daß ein Teil der Imagines nach einmaliger Überwinterung nicht zum Vorschein kommt, sondern zweimal überwintert. Dieses Verhalten kann man auch bei anderen Blattkäferarten (z. B. beim Kartoffelkäfer) verzeichnen [3].

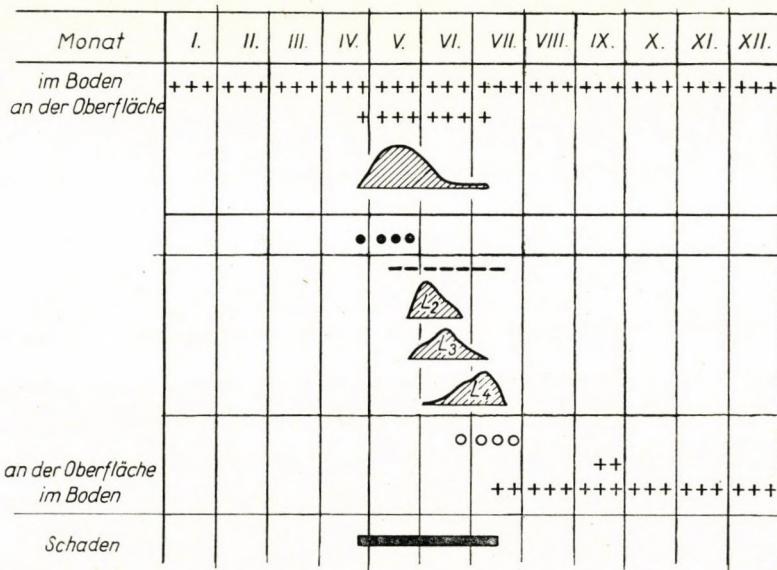


Abb. 19. Phänologischer Kalender des Senfkäfers im Jahre 1957 in der Umgebung von Kesztely. ● = Ei, - - = Larve, ○ = Puppe, + = Imago, — = Schaden, = die Häufigkeit der Entwicklungsstadien

Die Eiablage nimmt bald nach dem Erscheinen der Imagines ihren Anfang. Nach den Ergebnissen der Laboruntersuchungen legen die Weibchen den größten Teil der Eier in 4 bis 5 Wochen nach ihrem Hervorkommen ab. Die Eiablage endet in der zweiten Junihälfte. Die Larven erscheinen ab Mitte Mai. Zufolge der Verzögerung der Eiablage kommen im Mai und Juni Larven aller vier Entwicklungsstadien zu gleicher Zeit vor. Im Juli sind nur Larven des dritten und vierten, vereinzelt auch des zweiten Entwicklungsgrades anzutreffen. Die Verpuppung kann Ende Mai beginnen und ab Mitte Juni sind auch schon Imagines sichtbar. Ein Teil dieser ändert nach einer Diapause von 3 bis 3 1/2 Monaten seinen Aufenthaltsort (im Boden), kommt jedoch nicht an die Oberfläche, sondern überwintert, fallweise sogar zweimal in einem Zuge. Nur

ein ganz geringer Teil der Vollkerfe erscheint noch im Spätsommer, zu Beginn des Herbstanfangs auf der Erdoberfläche, verzieht sich aber von da nach kurzem Aufenthalt zur Überwinterung in den Boden.

## LITERATUR

1. ANONYMUS (1940) Plantesygdomme i Danmark (1939, 1941/43). *Tidsskr. Planteavl Copenhagen*, **45**, 193—258; **47**, 189—271; **48**, 1—90; **49**, 1—72.
2. BOLLMANN (1951) Senfblattkäfer — *Colaphellus sophiae* SCHALL. — als Rapsschädling im Gebiet des Stadtkreises Magdeburg. *Nachrblatt Deutschen Pflanzenschutzdienst*, N. F., **5**, 235.
3. JERMY, T., SÁRINGER, Gy. (1955) A burgonyabogár (*Leptinotarsa decemlineata* SAY) Der Kartoffelkäfer, *Leptinotarsa decemlineata* SAY. *Mezőgazdasági Kiadó*, Budapest. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
4. JERMY, T. (1958) Untersuchungen über Auffinden und Wahl der Nahrung beim Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata* SAY). *Ent. exp. E. appl.*, **1**, 197—208.
5. KIRCHNER, O. (1923) Die Krankheiten und Beschädigungen unserer landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Stuttgart.
6. LANGENBUCH, R. (1952) Ist das Fehlen eines »Fraßstoffes« oder das Vorhandensein eines »Vergällungsstoffes« die Ursache für die Resistenz der Wildkartoffel *Solanum chacoense* BITT. gegenüber dem Kartoffelkäfer? *Z. Pfl. Krankh.*, **59**, 179—189.
7. LEGATOW, V. V. (1931) An attempt to control *Colaphellus sophiae* SCHALL. *Plant Protection, Leningrad*, **7**, 169—170. (Rev. appl. Ent., **20**, 92, 1932).
8. MANOLACHE, F. C. (1941) Cercetări morfologice, biologice și de combatere asupra insectei *Entomoscelis adonidis* PALL. in România. *Institutul de cercetări agronomice al României metode, indrumări, rapoarte, anchete, Bucuresti*, **71**, 4. (Rumänisch, französische Zusammenfassung.)
9. MÜLLER, F. P. (1947) *Colaphellus sophiae* SCHALL. (Chrysomel.) als Schädling auf kultiviertem Brachland im Gebiet von Berlin. *Nachrbl. Deutschen Pflanzenschutzdienst*, N. F., **1**, 70—71.
10. MÜLLER, F. P. (1950) Über Schadaufreten und Biologie von *Colaphellus sophiae* SCHALL. (Chrysomel.). *Z. ang. Ent.*, **31**, 591—608.
11. REITTER, E. (1912) Fauna Germanica. IV. Die Käfer des Deutschen Reiches, Stuttgart.
12. RITZEMA Bos, J. (1880) De mosterdtor of het sophiahaantje [*Colaspidema (Colaphus) sophiae* F.] *Tijdschrift voor Entomol.*, **23**, 139—151.
13. RITZEMA Bos, J. (1891) Kurze Mitteilungen über Insektenfraß in den Niederlanden in den Jahren 1890/91. *Z. Pflanzenkrankheiten*, **1**, 341—343.
14. SACHAROW, N. L. (1913) *Report of the Entomological Station of the Astrachan Society of Fruit-growing, Gardening, Market-gardening, and Field-cultivation. Astrachan.* (Rev. appl. Ent., **1**, 534, 1913.)
15. SACHAROW, N. L. (1913) On the pests of Mustard. Astrachan Horticultural, Market-gardeners and Agricultural Society. Astrachan. (Rev. appl., Ent., **1**, 536, 1913.)
16. SACHAROW, N. L. (1914) Pests of mustard and methods fighting them (preliminary observations). *Report of the Entomological Station of the Astrachan Society of Fruit-growing, Market-Gardening and Agriculture, Astrachan.* (Rev. appl. Ent., **2**, 355—356, 1914).
17. SACHAROW, N. L. (1915) The injurious insects, noticed in the govt. of Astrachan from 1912 to 1914. *From the report of the station for 1914. Published by the Entomological Station of Astrachan. Astrachan.* (Rev. appl. Ent., **3**, 219, 1915)
18. SÁRINGER, Gy. (1957) A repedárász [*Athalia rosae* L. (= colibri CHRIST.)] Tenthredinidae; Hym. Die Rübenblattwespe [*Athalia rosae* L. (= colibri CHRIST.)] Tenthredinidae; Hym. *Annales Inst. Prot. Plant. Hung.* (1952/1956), **7**, 125—183. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
19. SÁRINGER, Gy. (1959) Új kártevőnk, a mustárbogár. Unser neuer Schädling, der Senfkäfer. *Magyar Mezőgazdaság*, **14**, 12—13. (Ungarisch.)
20. SÁRINGER, Gy. (1960) Adatok a mustárbogár (*Colaphellus sophiae* SCHALL., Coleoptera: Chrysomelidae) fejlődési alakjainak, elterjedésének, valamint kártételenek ismeretéhez. Beiträge zur Kenntnis der Entwicklungsstadien und der Verbreitung des Senfkäfers (*Colaphellus sophiae* SCHALL.) sowie der von ihm verursachten Schäden. *Fol. Entom. Hungarica*. **13**, 207—250. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung).

21. SÁRINGER, Gy. (1960) Unveröffentlichte Resultate.
22. SCHREINER, J. T. (1915) Insects injurious to mustard in the govt. of Astrachan. *The Protection of Plants, Petrograd*, 5—6, 55. (*Rev. appl. Ent.*, 3, 637, 1915)
23. SPEYER, W. (1954) *Colaphus (Colaphellus) sophiae* SCHALL., Senfkäfer. In SORAUER, Handbuch der Pflanzenkrankheiten, 5, 297.

**OECOLOGICAL INVESTIGATION OF THE MUSTARD BEETLE  
(COLAPHELLUS SOPHIAE SCHALL.)**

In continuation of our plan of work drawn up for the investigation of animal associations dwelling on rape and mustard plants, we have now ascertained the autoecology of *Colaphellus sophiae*, a beetle that was formerly unknown in Hungary as a pest but has caused considerable damage in the course of recent years. Our data are based on observations and researches made during a period of 4 years.

The imagoes stay in the soil during winter, and begin to come to the surface from the middle of March. The result of collections made during 70 years prove that the earliest date of the appearance of imagoes in Hungary is the first decade of March and the latest one the first decade of July. It was on *Capsella bursa-pastoris*, *Lepidium draba*, *Sinapis alba* and *Brassica napus* f. *annua* et f. *biennis*, all of them plants cultivated on ploughland, that we observed feeding imagoes during spring. The copulation of the imagoes began 1 to 1 1/2 week after their appearance. Likewise 1 to 1 1/2 week elapsed between copulation and the appearance of the first eggs. These are laid between the clods of the soil and form larger or smaller irregular piles. The number of eggs per pile averaged 27 in April, 21 in May and 30 in June. Outside of the laboratory, the latest period of ovulation is the middle of July.

Larvae undergo three ecdyses which means four stages of development. The life of the larvae runs its course on the plants. Having finished to take nourishment, the animals crawl to the ground and, after finding an adequate spot, dig themselves into the soil and prepare the chambers in which they pupate. After the last moulting, most of the mature imagoes remained in the soil until next spring; a small part of them emerged only after the second winter. Some of them came to the surface in September, took up a little food and crawled back into the soil to remain there until next spring. In the case of larvae, raised in individual cultures on *Sinapis alba*, *S. arvensis*, *Brassica napus* f. *biennis*, *Lepidium draba*, and *Capsella bursa-pastoris* plants, the total duration of the larval, prepupal and pupal stage varied between 34,4 and 35,8 days. We raised 50 larvae on each of the said plants and found no significant difference between the respective rates of their development, while those grown on mustard plant reached a higher body weight which shows that — with an equal rate of development — the uptake of nourishment from *Sinapis alba* exceeds that from other plants. Experiments have proved the mustard beetle to be oligophagous, and we have chosen the term "mustard beetle" because the examined specimens of *Colaphellus sophiae* preferred *Sinapis alba* to all other plants used in our experiments. It was found that the imagoes need a diapause of 3 to 3 1/2 months before their biological activity starts. This shows that diapause is a true one in the case of the mustard beetle.

Only a single generation per year is produced by the animal in Hungary.

**ИССЛЕДОВАНИЯ ОБРАЗА ЖИЗНИ ГОРЧИЧНЫХ ЛИСТОЕДОВ  
(COLAPHELLUS SOPHIAE SCHALL.)**

В рамках рабочей программы, посвященной исследованию зооценозов растений рапса и горчицы, авторы на основе четырехлетних наблюдений разработали автэкологию *Colaphellus sophiae*, до сих пор в Венгрии как вредитель еще неизвестного, но за последние годы причинявшего значительный вред, листоеда.

Половозрелая форма насекомого зимует в почве и со серединой марта начинает появляться на поверхности. Согласно собранному в Венгрии в течение 70 лет материалу, половозрелую форму листоеда удалось ловить раньше всего в первой декаде марта, а позже всего в первой декаде июля. На пашнях она наблюдалась весной во время питания на культурах *Capsella bursa-pastoris*, *Lepidium draba*, *Sinapis alba* и *Brassica napus* f. *annua* и *biennis*. Спаривание началось через 1—1 1/2 недели после их появления. По истечению такого же срока после спаривания появились первые яйца. Листоед откладывал

яйца между почвенными комками, в больших или меньших нерегулярных кучках. В одной кучке в апреле находились в среднем 27, в мае 21, а в июне 30 яиц. Последним сроком откладывания яиц на открытом грунте была середина июля.

Линька происходит три раза, значит, они имеют четыре стадии развития. Личинки живут на растениях. После окончания питания они сползают в почву, и изысканная подходящее место вкапываются в почву, изготавливая там для закукливания камеру. Большая часть половозрелой формы насекомого после линьки осталась в почве до последующей весны, а небольшая часть появилась на поверхности только после двух перезимовок. Несколько насекомые выползло в сентябре для питания на короткое время на поверхность, но вскоре вновь ушло в почву на зимовку. В случае выращивания на индивидуальных культурах на растениях *Sinapis alba*, *S. arvensis*, *Brassica napus f. biennis*, *Lepidium draba* и *Capella bursa-pastoris* личиночная, предкукольная и кукольная стадии вместе взято длились 34,4 до 35,8 дней. В скорости развития по 50 личинок, выращиваемых на вышеприведенных растениях, не показалось значительной разницы, только выращенные на горчице экземпляры имели больший вес; данное обстоятельство указывает на то, что на *Sinapis alba* при такой же скорости развития принятие пищи больше. Согласно исследованиям по выбору пищи горчичный листоед относится к животным, имеющим несколько растений для питания (олигофаг). Ввиду того, что он из всех исследованных растений предпочитал *Sinapis alba*, он получил название — горчичный листоед. Согласно исследованиям диапаузы, половозрелые формы листоеда должны оставаться в диапаузе в течение 3 до  $3\frac{1}{2}$  месяцев для того, чтобы наступила их жизнедеятельность. Следовательно, в случае горчичного листоеда мы имеем дело с настоящей диапаузой.

В Венгрии горчичный листоед имеет лишь одно поколение.

GYULA SÁRINGER, Keszthely, Felszabadulás-u. 1/a, Ungarn.



# THE ROLE OF THE NERVOUS SYSTEM IN THE MAINTENANCE OF THE RIBONUCLEIC ACID AND DESOXYRIBONUCLEIC ACID CONTENT OF STRIATED MUSCLE TISSUE

G. HOLLÓSI, I. BENEDECZKY, A. TIGYI and K. LISSÁK

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY AND BIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY, PÉCS (HEAD: K. LISSÁK)

(Received March 15, 1960)

## Summary

The effect of neurotomy and tenotomy on the nucleic acid content of striated muscles of albino rats and Amphibia was studied. The experimental investigations supplied the following evidence.

As determined on the 3rd, 7th and 12th days after denervation, the DNA content increased and the RNA content decreased. The increase of DNA content is associated with an increase in the number of subsarcolemmal nuclei. Elimination of the sympathetic innervation cannot be held responsible for the effects observed. The neurotomy-induced changes in the nucleic acid content of muscles are significantly different from those caused by tenotomy, from which it may be concluded that trophic nervous effects play a significant role in the nucleic acid metabolism of striated muscles. There was no significant change in the nucleic acid content of the gastrocnemius muscle of *Rana esculenta* on the 3rd and 12th days following neurotomy and tenotomy, respectively.

## Introduction

The information available as to the regulation of the nucleic acid metabolism in different tissues is rather defective. On the basis of investigations with  $P^{32}$  isotope it has been suggested [7] that desoxyribonucleic acid (DNA) is a relatively inert component of the cells, whereas ribonucleic acid (RNA) plays an active role in cellular metabolic processes. This statement applies exclusively to the DNA in the so-called resting cells, because the proliferative organs (bone marrow, spleen, thymus, intestinal mucosa), which are high in DNA, show a  $P^{32}$  incorporation much greater than that by liver, kidney, muscle or brain tissue, in which there is only a minimal mitotic activity. Thus, the above statements should be so formulated that while RNA shows intense metabolic activity in the resting cells, too, the activity of DNA is restricted to the proliferative viscera.

There is rather abundant evidence in the literature concerning the factors, physiological and pathological, that influence the biosynthesis of nucleic acids. In their survey, BROWN and ROLL [2] have pointed out that although the diet, changes in the function of the endocrine glands, as well as certain physiological stressor effects are rather well-known to influence the biosynthesis of nucleic acids, there are but a few substances that may be supposed

to have a direct role in biosynthesis, such as first of all folic acid and vitamin B<sub>12</sub>.

The role of the above-mentioned biological factors is illustrated by the following, more important experimental data. CAMPBELL and KOSTERLITZ [3] have found the RNA concentration of the liver decreased and the DNA concentration unchanged in rats fed on a protein-free diet. Many workers have studied the effect of various hormones on the biosynthesis of nucleic acids, but no specific effects could be demonstrated. It was only insulin that has been proved to have such an effect [13]: insulin-treated chick heart explants contained significantly more of RNA per cell than the untreated specimens, while there was no difference between the two groups in lipid and protein content. ALLARA [1] studied the role of stress on the adrenals. In response to cold or fatigue the DNA and the cytoplasmic RNA content of the zona glomerulosa definitely decreased in the adrenal cortex of the rat, while other, stressor effects produced an increase in nucleic acid content.

There is, however, scarce evidence as to the role of nervous actions. The RNA and DNA content of the peripheral nerve showing Waller degeneration increases gradually till the 16th day, then on the 32nd day, in the phase of intense cell proliferation, the RNA/DNA ratio increases from 0,9 to 2,0 [15]. Following transection of the motor nerve the atrophied striated muscle shows a weight loss of 60 per cent, an RNA depletion of 55 per cent and a protein loss of 70 per cent [12]. In the denervated skin the DNA content is reduced by 17 per cent, the RNA content by 10 per cent, then the nucleic acid concentration becomes normal again one month after denervation [14].

This survey of the outstanding published data makes it clear that the investigations into the regulation of the nucleic acid content of tissues are merely informative in character and no uniform view could be evolved. In recent years we have been making extensive studies of the functional changes in denervated tissues [21, 22]; we now extended these investigations, placing the problem of the regulation of nucleic acid metabolism in the foreground. We had two aims: 1. to decide in what measure nucleic acid metabolism is affected by the characteristic and well-known morphological and functional changes following muscle denervation, and 2. to determine whether the neural component had any regulatory role in the maintenance of the RNA and DNA content of muscle.

### Methods

Albino rats (*Epimys rattus* var. *albino*) of either sex, weighing 100 to 150 g were used. Under ether and aseptic conditions a 10 mm part of the sciatic nerve was excised unilaterally, to achieve total denervation of the gastrocnemius muscle. The contralateral gastrocnemius served as the control.

To determine in what measure inactivity alone influences the nucleic acid content of the muscle, in an other group of rats monolateral Achilles tenotomy was performed. Using the same methods, 30 frogs (*Rana esculenta*) underwent gastrocnemius denervation and 30

others tenotomy of the tendon Achillis. The effects of denervation and of tenotomy were studied 3, 7 and 12 days after operation. After decapitation the gastrocnemius muscle was prepared and frozen without delay, weighed by torsion scales and homogenized in a Potter homogenator with intense cooling. The total homogenate was tested for DNA and RNA content according to SCHNEIDER [19], using desoxyribose and d-ribose, resp. as standards.

Nucleic acid content is expressed in absolute and relative values. The absolute values indicate the total nucleic acid content of wet muscle, the relative ones are those for 100 g of wet muscle weight.

The effect not only of total, but also of partial denervation was examined as to the nucleic acid content of striated muscles. Lumbar sympathectomy was performed in rats, eliminating thereby the sympathetic fibres from the sciatic nerve, but leaving the sensory and motor fibres intact. As in most cases there is no way to separate the bilateral sympathetic chains from one another in the rat, unilateral sympathectomy was not feasible. We have therefore performed total lumbar sympathectomy and used sham-operated rats as the controls. Lumbar sympathectomy was performed by the technique of INGLE and GRIFFITH [8].

### Results

It was found first of all that as compared with the weight of the control rat muscles, that of both the denervated and tenotomized muscles decreased after operation. The loss of weight was more marked with the denervated muscles.

Table I

*Changes in the weight of denervated and tenotomized gastrocnemius muscles of the rat*

Number of animals	Postoperative days	Average weight of normal muscles mg	Average weight of denervated muscles mg	Percentage change in muscle weight	Average weight of normal muscles mg	Average weight of tenotomized muscles mg	Percentage change in muscle weight
15	3	272	254	-6,6	222	217	-2,3
15	7	341	293	-14,1	403	391	-3,0
20	12	346	280	-19,1	319	278	-12,9

The DNA content of denervated muscle tends to increase on the 3rd postoperative day already. The change in the absolute DNA value becomes significant on the 7th day and reaches 45,1 per cent, a very highly significant change, on the 12th day.

The absolute DNA content of tenotomized muscles was slightly decreased 3 days after operation, then tended to increase, but the change did not reach the border of significance on the 12th day, either.

Conversion of the absolute values into relative ones makes it clear that increase of DNA content is significant in denervated muscles on the 3rd day already, while at that time no change yet is observable in tenotomized muscles.

The absolute RNA content decreases in both the denervated and tenotomized muscles. This tendency is more marked in the denervated muscles, in which the decrease of RNA content becomes significant and at the same time the greatest on the 7th day (30,1 per cent); on the 12th day, on the other hand,

it is near the normal level again (Table 2). The decrease of RNA content is not significant in the tenotomized muscles (Table 3).

Table 2

*Denervated and normal gastrocnemius muscles. DNA and RNA content, in absolute values*

Number of animals	Post-operative days	N mean DNA content, $\mu\text{g}$	D mean DNA content, $\mu\text{g}$	Percentage N-D difference	P	N mean RNA content, $\mu\text{g}$	D mean RNA content, $\mu\text{g}$	Percentage N-D difference	P
15	3	161	176	+ 9,3	>0,1	212	198	-6,7	>0,2
15	7	191	243	+27,2	<0,01	263	184	-30,1	<0,001
20	12	197	286	+45,1	<0,001	260	251	-3,5	<0,001

N — normal muscles

D — denervated muscles

P — significance of difference between series N and D.

Table 3

*Absolute DNA and RNA content of tenotomized and normal gastrocnemius muscles*

Number of animals	Post-operative days	N mean DNA content $\mu\text{g}$	T mean DNA content $\mu\text{g}$	Percentage N-T diff.	P	N mean RNA content $\mu\text{g}$	T mean RNA content $\mu\text{g}$	Percentage N-T difference	P
15	3	124	121	-2,4	>0,6	173	171	-1,2	>0,8
15	7	204	222	+8,8	>0,06	314	310	-1,3	>0,7
20	12	179	206	+15	>0,9	236	231	-2,2	>0,7

N — normal muscles

T — tenotomized muscles

P — significance between series N and T.

Table 4

*Relative DNA and RNA content of denervated and normal gastrocnemius muscles*

Number of animals	Days after operation	N mean DNA content $\mu\text{g}$	$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$	D mean DNA content $\mu\text{g}$	$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$	Percent diff. N-D	N mean RNA content $\mu\text{g}$	$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$	D mean RNA content $\mu\text{g}$	$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$	Percent diff. N-D
15	3	59	$\pm 0,2$	69	$\pm 0,1$	+16,9	78	$\pm 0,4$	78	$\pm 0,1$	—
15	7	56	$\pm 0,6$	83	$\pm 0,2$	+48,2	77	$\pm 0,2$	63	$\pm 0,1$	-18,2
20	12	57	$\pm 0,6$	102	$\pm 1,4$	+78,9	75	$\pm 0,1$	89	$\pm 1,0$	+18,6

$S_{\bar{x}}$  = standard error of the mean.

Table 5

*Relative DNA and RNA content of tenotomized and normal gastrocnemius muscles*

Number of animals	Days after operation	N mean DNA content $\mu\text{g}$	$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$	T mean DNA content $\mu\text{g}$	$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$	Percent diff. N—D	N mean RNA content $\mu\text{g}$	$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$	T mean RNA content $\mu\text{g}$	$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$	Percent diff. N—T
15	3	56	$\pm 0,3$	56	$\pm 0,5$	—	78	$\pm 0,3$	78	$\pm 0,4$	—
15	7	51	$\pm 0,3$	57	$\pm 0,4$	+117	78	$\pm 0,1$	79	$\pm 0,1$	+12
20	12	56	$\pm 0,3$	74	$\pm 0,5$	+321	74	$\pm 0,5$	83	$\pm 0,2$	+12,1

$S_{\bar{x}}$  = standard error of the mean

Tables 4 and 5 show that relative RNA content in the gastrocnemic muscle is unchanged on the 3rd day following denervation or tenotomy. On the 7th day there is a decrease of 18,2 per cent in the denervated muscle, as compared with the contralateral control, while in the tenotomized muscle there is an increase of 12 per cent. On the 13th day an increase is noted in both kinds of muscle.

There was no significant difference in nucleic acid content between the gastrocnemius muscles of the sympathectomized and sham-operated animals even as late as on the 12th day after operation (Table 6).

Table 6

*DNA and RNA content of gastrocnemius muscles after sympathectomy\**

Number of animals	Days after operation	N mean DNA content $\mu\text{g}$	$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$	S mean DNA content $\mu\text{g}$	$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$	Percent diff. N—D	N mean RNA content $\mu\text{g}$	$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$	S mean RNA content $\mu\text{g}$	$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$	Percent diff. N—S
10	7	56	$\pm 0,1$	56	$\pm 0,05$	—	78	$\pm 0,2$	79	$\pm 0,2$	1,2
8	12	56	$\pm 0,1$	57	$\pm 0,1$	+1,7	78	$\pm 0,3$	79	$\pm 0,2$	1,2

N — normal muscles

S — muscles of sympathectomized animals

\* — in 100 mg wet tissue.

The same applies to the denervated and tenotomized gastrocnemius muscles of frogs; these muscles showed no change in weight, either, on the 12th day following operation.

### Discussion

The experiments on rats indicate that already in the early phase of muscle degeneration following denervation and the elimination of neural control the nucleic acid content of striated muscles undergoes significant

changes. An early, excessive increase in the DNA content takes place especially in the denervated muscles.

Several hypotheses may be suggested to explain this. The statement that the DNA content of cells is located in the nuclei is valid for most animal cells; thus, the post-denervation change in DNA content is apparently correlated with changes, qualitative or quantitative, in the subsarcolemmal nuclei of muscle.

The relative DNA content may increase without necessarily being associated with changes in the subsarcolemmal nucleus count. SCHIEFFERDECKER [18] has shown that the elimination of the neural control severely affects the cytoplasm, induces cytoplasmic atrophy, as a result of which the nucleus-cytoplasm ratio, too, changes.

We have found an absolute increase in the total muscle DNA content after denervation, thus the increase was not merely relative, but absolute, *i.e.* DNA synthesis increased in the denervated muscle.

To decide whether the increase of DNA content was correlated with an increase of the subsarcolemmal nucleus count, or — in contrast with the classic doctrine of nucleus DNA constancy [24] — the increased nucleic DNA synthesis was not accompanied by a change in the number of nuclei, the nuclei were counted by the nucleus variation technique (Carnoy fixation, embedding in paraffine, staining with gallocyanin) in sections of normal, denervated and tenotomized muscles. Gallocyanin is eminently suitable for this purpose, being an almost fully elective chromatin staining dye, thus it stains nuclei sharply [10].

It has been shown by this method that number of nuclei in the denervated muscle was increased by 6,2 per cent on the 3rd day, 19,4 per cent on the 7th, and 34,0 per cent on the 12th day; at the same time, in the tenotomized muscle there was no change on the 3rd day, an increase of 2,1 per cent was noted on the 7th day and an increase of 7,6 per cent was found on the 12th day.

These data make it clear that both operations were followed by an increase of DNA content, associated with an increase of the number of subsarcolemmal nuclei. However, the increase of DNA content was not parallel with that in the number of nuclei. Further studies involving also a refined counting technique and measurement of nuclear volume are required to analyze the effect in more detail.

It is highly characteristic of the post-denervation change in the RNA content of muscle that the greatest decrease occurs 7 days after operation. The subsequent RNA increase seems to be temporary only, because muscle atrophy is even more marked 12 to 20 days after operation and the protein content, too, is diminished in the muscle undergoing atrophy.

The results of the experiments on rats demonstrate that the elimination of peripheral innervation alters more significantly and in many cases in an

other sense the nucleic acid content of striated muscles, than do the effects resulting from muscle degeneration due to simple inactivity (disuse atrophy). From this fact one might conclude that in the nucleic acid metabolism of striated muscles, even when an inactivity component is obviously involved, a significant role should be attributed to trophic nervous effect.

The experiments on sympathectomized animals suggest that an elimination of the sympathetic system cannot be held responsible for the effects observed in the early phase of muscle degeneration. These data supplement the evidence published by JONNESCO [9], FLORESCO [6], COATES and TIEGS [4], TAKAHASHI [20], FELDBERG [5] and NEVIN [16] who found no changes indicative of a degeneration or atrophy of muscles following sympathetic denervation.

Published data indicate that sensory denervation cannot produce the effects described. TOWER [23] found no morphological changes of any kind in cats even as late as 1 year after sensory denervation obtained by ganglionectomy of the posterior root of the spine. It may therefore be justified to claim that an elimination of motor innervation is responsible in the first place for the post-denervation reaction of muscle.

From the comparative biological viewpoint it is noteworthy that — in the period of the test — elimination of the neural control and tenotomy produced no change in the nucleic acid content in amphibia. There are a number of pertaining data in the literature. As early as 1926, KNOWLTON [11] pointed out that the development of muscle degeneration is species-characteristic in its course. The post-denervation degeneration develops much later in amphibia than in mammals.

NOVOTNY [17] has found a slight decrease in the glycogen content of the muscle of *Periplaneta americana* only as late as on the 30th day following denervation. This species-characteristic course of muscle degeneration applies also to the changes in the nucleic acid content of muscles and therefore it must be emphasized that our experimental results are valid apparently for mammals only.

#### REFERENCES

1. ALLARA, E. (1956) Gli acidi nucleinici nel corticosurrene di ratto ed il loro comportamento in alcuni tipi di stress. *Lo Sperimentale* **106**, 1—16.
2. BROWN, G. B., ROLL, P. M. (1955) Biosynthesis of nucleic acids. In CHARGAFF, E., DAVIDSON, J. N. The nucleic acids. Academic Press, New York **2**, 341—392.
3. CAMPBELL, R. M., KOSTERLITZ, H. W. (1947) Dietary factors influencing nucleic acid content. *J. Physiol.*, **106**, 12.
4. COATES, H. E., TIEGS, O. W. (1930) Further observations on certain alleged effects of sympathetic nerves on skeletal muscle. *Australian J. Exper. Biol. and Med. Sci.*, **7**, 37—44.
5. FELDBERG, W. (1926) Experiments on the degeneration of striated muscle fibers after sympathetic denervation. *J. Physiol.*, **61**, 32—41.

6. FLORESCO, N. (1903) Influence de la résection du nerf sympathique cervical sur les plaques motrices et les vaisseaux des muscles. *C. R. Soc. Biol.*, **55**, 228—234.
7. HEVESY, G. (1948) Nucleic acid metabolism. In LAWRENCE, H., HAMILTON, J. G. Advances in biological and medical physics. Academic Press, New York, **1**, 400—454.
8. INGLE, D. J., GRIFFITH, J. Q. (1942) Surgery of the rat. In FARRIS, E. J., GRIFFITH, J. Q. *The Rat*. J. B. Lippincott Co. Philadelphia. 434—452.
9. JONNESCO, T., FLORESCO, M. (1902) Phénomènes observés après la résection du nerf sympathique cervical chez l'homme. *J. de Physiol. et de Path. gen.*, **4**, 845—854.
10. KISZELY, Gy., BARKA, T. (1958) Gyakorlati mikrotechnika és histokémia. (Practical micro-technique and histochemistry) Budapest, Egészségügyi Könyvkiadó. 86—87.
11. KNOWLTON, G. C., HINES, H. M. (1936) Kinetics of muscle atrophy in different species. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **35**, 394—406.
12. LESLIE, I. (1955) The nucleic acid content of tissues and cells. In CHARGAFF, E., DAVIDSON, J. N. *The nucleic acids*. Academic Press, New York, **2**, 1—50.
13. LESLIE, I., DAVIDSON, J. N. (1951) The effect of insulin on cellular composition and growth of chick heart explants. *Biochem. Journal*, **49**, ×/i
14. Липкан, М. Ф. (1956) Обмен нуклеиновых кислот в денервированной коже. *Физиол. журн. АН УССР*, (6), 115—121.
15. LOGAN, J. E., MANNEL, W. A., ROSSITER, R. J. (1952) Chemical studies of peripheral nerve during Wallerian degeneration. *Biochem. J.*, **51**, 482—487.
16. NEVIN, S. (1930) Degeneration changes after unilateral lumbar sympathectomy. *J. Physiol.* **70**, viii.
17. NOVOTNY, I. (1958) Metabolism of denervated insect muscle. *Acta Soc. Zool. Bohem.*, **22**, 232—237.
18. SCHIEFFERDECKER, P. (1909) Muskeln und Muskelkerne. Barth, Leipzig.
19. SCHNEIDER, W. C. (1945) Extraction and estimation of DNA and RNA. *J. Biol. Chem.*, **161**, 293—299.
20. TAKAHASHI, N. (1922) Untersuchungen über die tonisierenden und trophischen Funktionen des Sympathicus. *Pflüger's Arch.*, **193**, 322—331.
21. TIGYI, A., KAJTÁR, Cs. (1951) Denerváció hatása a bronchusizomzat érzékenységre. Effect of denervation on the sensitivity of broi c'ial muscle. *Kísér. Orvostud.*, **3**, 25—29. (In Hungarian.)
22. TIGYI, A. (1953) Adatok a denervációs érzékenység fokozódás mechanizmusához. Contributions to the increase in denervation sensitivity. *Kísér. Orvostud.*, **5**, 293—295. (In Hungarian.)
23. TOWER, S. S. (1931) A search for trophic influence of posterior spinal roots on skeletal muscle, with a note on the nerve fibers found in the proximal stumps of the roots after excision of the root ganglia. *Brain*, **54**, 99—108.
24. VENDRELY, R. (1955) The deoxyribonucleic acid content of the nucleus. In CHARGAFF, E., DAVIDSON, J. N. *The nucleic acids*. Academic Press, New York, **2**, 155—180.

## DIE ROLLE DES NERVENSYSTEMS IN DER AUFRECHTERHALTUNG DES RIBO- UND DESOXIRIBONUKLEINSÄUREGEHALTES IM QUERGESTREIFEN MUSKELGEWEBE

Es wurde die Wirkung von Neurotomie und Tenotomie auf die Veränderung des Nukleinsäuregehaltes im quergestreiften Muskel von weißen Ratten und Amphyben untersucht. Am 3., 7. und 12. Tage nach dem Eingriff wurde festgestellt, daß der DNS-Gehalt des denervierten Muskels sich erhöht, während der RNS-Gehalt abgenommen hatte. Gleichzeitig mit der Erhöhung des DNS-Gehaltes war auch die Zahl der subsarkolemmalen Kerne gestiegen. Für die beobachteten Effekte kann der Ausfall des sympathischen Innervation nicht verantwortlich gemacht werden. Zwischen den durch Neurotomie und Tenotomie verursachten Veränderungen des Nukleinsäuregehaltes der Muskel besteht ein signifikanter Unterschied, woraus die Folgerung abgeleitet werden kann, daß im Nukleinsäurestoffwechsel der quergestreiften Muskel der trophischen Wirkung des Nervensystems unbedingt eine Bedeutung zuzuschreiben ist. Der Nukleinsäuregehalt des neurotomisierten und tenotomisierten *Musculus gastrocnemius* von *Rana esculenta* zeigt am 3. und 12. Tage nach der Operation keine signifikante Veränderung.

РОЛЬ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В ПОДДЕРЖАНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ РИБО- И  
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ТКАНИ ПОПЕРЕЧНОПОЛОСАТЫХ  
МЫШЦ

Исследовалось действие нейротомии и тенотомии на изменение содержания нуклеиновой кислоты в поперечнополосатых мышцах альбиносовых крыс и амфибий. Содержание ДНК в денервированных мышцах повышается, а содержание РНК снижается в случае исследования на 3., 7 и 12 день после операции. Одновременно с повышением содержания ДНК число ядер субсарколеммы также повышается. Выпадения симпатической иннервации нельзя считать ответственным за это явление. Между изменением содержания нуклеиновой кислоты в мышцах, вызванным нейротомией или же тенотомией, наблюдается сигнификаントная разница; из этого факта авторы заключают, что в метаболизме нуклеиновой кислоты поперечнополосатых мышц непременно следует приписать важное значение трофическому действию нервной системы. Содержание нуклеиновой кислоты нейротомизированной и тенотомизированной икроножной мышцы *Rana esculenta* на 3. и 12. день после вмешательства не показало сигнификаントного изменения.

GÁBOR HOLLÓSI, Pécs, Rákóczi út 80., Hungary.

IMRE BENEDECZKY, Pécs, Rákóczi út 80., Hungary.

ANDRÁS TÍGYI, Pécs, Rákóczi út 80., Hungary.

KÁLMÁN LISSÁK, Pécs, Rákóczi út 80., Hungary.



# BEITRÄGE ZUR ENTWICKLUNGSGESCHICHTE DES GYNÄZEUMS VON DATURA STRAMONIUM L.

GIZELLA VERZÁR-PETRI und GABRIELLA BARANYAI-SZENTPÉTERY

INSTITUT FÜR ANGEWANDTE BOTANIK UND HISTOGENESE DER EÖTVÖS LORÁND UNIVERSITÄT,  
BUDAPEST (VORSTAND: S. SÁRKÁNY)

(Eingegangen am 20. März 1960)

## Zusammenfassung

Die Frage nach der Gestaltung des Fruchtknotens steht — wie es auch aus dem Studium der einschlägigen Literatur erhellte — noch immer offen, da Angaben sowohl für den axialen als für den foliaren Ursprung des Fruchtknotens vorliegen.

Um einen genaueren Einblick in die morphologische Natur und den Entwicklungsgang dieses Organs zu gewinnen, wurden unsererseits eingehende Studien über *Datura stramonium* L. ausgeführt. Unsere Wahl fiel auf diese Pflanze unter anderem aus dem Grund, daß die Fruchtknotenbildung bei der Familie der Solanaceen und innerhalb dieser bei *Datura stramonium* schon von mehreren Forschern, deren Folgerungen einander widersprechen, untersucht worden ist.

Die von uns angeführten Beobachtungen erstreckten sich auf sämtliche Entwicklungsstufen, von der 2 mm großen reproduktiven Sproßspitze bis zur Blüte, wobei einerseits die histogenetischen Phasen der Fruchtknotenausbildung an sukzessiven Schnitten, andererseits aber die einzelnen morphogenetischen Phasen, im Stereomikroskop verfolgt wurden.

Auf Grund unserer Untersuchungen sind wir — im Gegensatz zu den in der Fachliteratur herrschenden Auffassungen — zur Ansicht gelangt, daß das Gynäzeum von *Datura stramonium* L. gänzlich als blattbürtig zu betrachten sei.

Die Fruchtknotenanlagen werden in der zweiten Tunica-Schicht der reproduktiven Spitze angelegt, wo sich eine durch Periklinalteilungen entstandene sog. subapikale Zellengruppe, ähnlich dem bei den Laubblättern ersichtlichen Prozess, dann vermehrt.

Im Entwicklungsgang des Gynäzeums können zwei Phasen unterschieden werden, und zwar die zu Beginn der Fruchtknotenausbildung wahrzunehmende und später unterdrückte peltate, und ferner die im Verlauf des weiteren Wachstums vorherrschende plikate Phase. Die Plikation bewirkt das Entstehen der primären Scheidewand, gefolgt von der Bildung der sekundären Scheidewand, die durch das Einschlagen der Karpellränder zustande kommt. Gegenüber den älteren morphologischen Darstellungen kann also die sekundäre Scheidewand nicht als Scheintrennwand angesehen werden.

Es erhellte ferner aus unseren Befunden, daß hinsichtlich der Histogenese des Gynäzeums die Plazentation der Samenanlagen als marginal bezeichnet werden dürfte.

## Einführung

Das Studium der Morphologie und Histogenese der reproduktiven Organe der Phanerogamen steht im Mittelpunkt der ontogenetischen und teilweise auch der philogenetischen Forschungen. Besondere Beachtung wird den Spermatophyten-Fruchtknoten und hauptsächlich der Frage ihres Ursprungs geschenkt.

Seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts ist über die Histogenese des Gynäzeums eine große Zahl von Arbeiten erschienen, in welchen aber sich

gänzlich verschiedene Auffassungen widerspiegeln. Von diesen sollen im Folgenden zwar nur die wichtigeren zusammengefaßt werden, solch einen Überblick zu geben erschien uns aber geboten, da über die Gestaltung des Fruchtknotens noch heute keine einwandfreie und einheitliche Ansicht herrscht, und somit die aus jüngster Zeit stammenden Theorien und Beweise die älteren Betrachtungen entweder entkräftigen oder aber Angaben zu derer Weiterentwicklung erbringen.

Schon in 1851 wies HOFMEISTER [13] darauf hin, daß der einkernige Embryosack der Samenanlage als eine der Makrospore der Farne homologe Bildung zu betrachten sei. Diese Feststellung spornte die Forscher zu weiteren Untersuchungen an, als deren Ergebnis dann GOEBEL [7], WARMING [37] und STRASBURGER [31] festgelegt haben, daß die Samenanlage mit dem Makrosporangium gleichwertig sei. Sie fanden ferner, daß die Fruchtschuppe der Gymnospermen dem Makrosporophyllum homolog ist und trachteten danach die Blattbürtigkeit beider Organe nachzuweisen. SCHÄFER's [28] Beobachtungen sprechen dafür, daß, obwohl die Fruchtschuppe sich allmählich modifiziert, in der Anlegung des Sporophylls und der Fruchtschuppe kein Unterschied festgestellt werden kann.

Viel schwieriger gestalten sich die Verhältnisse hinsichtlich der richtigen Beurteilung der Angiospermen-Fruchtknoten. Manche glauben nämlich dem Fruchtknoten der Angiospermen — im Gegensatze zu dem der Gymnospermen und der Farne — den Blattcharakter absprechen zu müssen, und viele sind es, die die Frage der Homologie hier noch heute nicht als endgültig klar gelegt betrachten; mehrere Forscher sind der Ansicht, daß der komplizierte Bildungsgang des Fruchtknotens gänzlich oder teilweise dem axialen Charakter dieses Organs zuzuschreiben wäre. DE CANDOLLE [zit. 19] versuchte als erster zu der Frage des Ursprungs und der Natur des Angiospermen-Gynäzeums eine Erklärung vorzulegen, indem, obwohl er den Fruchtknoten für blattbürtig hält, in der Ausbildung der Basis auch der Achse eine Rolle zuspricht.

Nach PAYER [20] lassen sich im Fruchtknoten ausdrücklich zwei Teile unterscheiden, und zwar ein die Samenanlagen tragender axialer, und ein nicht axialer, sog. appendikulärer Teil.

VAN TIEGHEM [32], der aber sich nur mit dem schon entwickelten Fruchtknoten befaßte, kommt zu dem Schluß, daß dieser entweder als Organ axialen oder foliaren Ursprunges angesprochen werden könnte, ja nachdem die Holz- und Bastteile der sich dort ausbildenden Leitbündel, eine dem Stengel oder dem Blatt entsprechende Anordnung aufweisen.

CELAKOVSZKY [4] war der erste, der im Gegensatz zu den erwähnten Autoren zu der Folgerung gelangte, daß der Fruchtknoten in seiner Gänze ein Organ foliaren Ursprunges sei. Seiner Ansicht nach bilden sich die Karpellanlagen in der Form von umgekehrten Kappen, oder Tuten aus; ihre in der Mehrzahl der Fälle ersichtlichen ventralen Spalten entstehen dadurch, daß die zu einander

gewandten und im Wachstum begriffenen transversalen Karpellränder nicht gänzlich aneinanderstoßen. Die schon von den Zeitgenossen stark kritisierte Theorie von CELAKOVSKY beruht aber auf der Annahme, daß die Samenknoten den Blattfiedern homolog seien. Basierend auf dieser Anschauung gelangte er — hauptsächlich im Zusammenhang mit der Plazentation — zu irrtümlichen Folgerungen.

GOEBEL [8] führte an, daß die Fruchtblätter schildförmigen Blättern ähnlich entstehen; die Ausbildung ihres Ventralteiles geht keineswegs von den vorher differenzierten Blatträndern aus, sondern hebt sich als ein geschlossener, von ihm als die »Sohle« des Karpells bezeichneter Wulst hervor, welcher mindestens gleichzeitig mit der vorschreitenden Differenzierung der Blattränder ausgebildet wird.

Auch SCHÄFER [28] erklärte sich für die Blattbürtigkeit des Fruchtknotens. Er untersuchte mehrere Familien mit ober- und unterständigem Fruchtknoten und befaßte sich in erster Linie mit der Gestaltung der Plazenta. Von ihm werden nicht allein die Pistillwände, sondern auch die Plazenten in jedem Fall als Organe foliaren Ursprungs gedeutet.

Nach einem Stillstand von mehreren Jahrzehnten sind neue Gedanken über die Frage der Fruchtknotengestaltung von GREGOIRE [10] aufgeworfen worden, welcher von der Anschauung ausging, daß eine Homologie von Fruchtknoten und Blatt oder Achse nur in dem Falle anzunehmen sei, wenn die Anlegung und weitere Entwicklung des Fruchtknotens mit einem der beiden identisch vor sich geht. Um das Problem klarzulegen, führte er vergleichende Untersuchungen am Vegetationskegel des reproduktiven und vegetativen Sprosses durch und gelangte zu der Folgerung, daß diese abweichenden Charakters sind. Seiner Darstellung nach nämlich »entstehen im letzteren die Blütenorgane aus einer zweireihigen subepidermalen Zellschicht, innerhalb dieser aber bietet sich eine inaktive parenchymatische Region dar, welche an der Ausbildung der Blüten spitze keineswegs teilnimmt«. Ferner hat er festgestellt, daß von den Blütenorganen die Staubblätter und die Karpelle nur Längenwachstum aufweisen und sonst »die für die Laubblätter charakteristische marginale Verbreiterung vermissen«. Darnach soll der Fruchtknoten der Angiospermen als ein Organ »sui generis«, also als keinem vegetativen Organ homolog, betrachtet werden.

Auf dem Gebiete der Gynäzeum-Forschung ist von besonderer Wichtigkeit die Tätigkeit von TROLL [33], welcher eine neue Theorie zu der Frage nach der morphologischen Wertigkeit einiger Gestaltungstypen des Fruchtknotens vorlegte. Er stellte die damals herrschenden Ansichten auf eine einheitliche Basis, indem er in einer jeden Erscheinungsform des coenokarpen Fruchtknotens das Vorhandensein der synkarpen, parakarpen und apokarpen Zone nachwies und damit die Bestätigung für eine einheitliche Ausbildung der verschiedenen Fruchtknotenarten darlegte. Einen Unterschied erblickt er nur in der

Verschiebung der fertilen Zone, bzw. in deren betonten oder unterdrückten Entwicklung. TROLL untersuchte sehr sorgfältig die Entwicklung des Laubblattes und in Zusammenhang damit auch die des schild-, bzw. schlauchförmigen Blattes [34]; bei letzterem widmete er große Aufmerksamkeit der Gestaltung und der Rolle der Querzone (Peltation) und ferner dem Einrollen der über derselben konvergierenden Spreitenränder (Plikation). Ein Vergleich zwischen der Entwicklung des schild-, bzw. schlauchförmigen Laubblattes und des Karpells ließ klar erkennen, daß hier eine volle Übereinstimmung herrscht [35].

Seither wurde der Entwicklungsgang der Blumenblätter (und somit auch der Karpelle) mit jenem der Laubblätter, von einer Anzahl von Forschern aus der TROLLSchen Schule [30, 35] verglichen und ihre identische Gestaltung auf histogenetischer Grundlage nachgewiesen.

Die TROLLSche Theorie wurde durch die morphologischen Untersuchungen von WINKLER [39], BAUM [1] und LEINFELLNER [16, 17] erhärtet, ja sogar mit weiteren Anhaltspunkten bereichert. So z. B. stellten letztere Forscher das Vorhandensein von vier Zonen im Fruchtknoten fest, also konnten sie vor der synkarpen Zone noch eine sackartige, plazentenfreie, sog. primär-synkarpe Zone beobachten. Die Entwicklung der Querzone wurde auch von BAUM untersucht und mit den parakarpfen, d. h. mit den im Verlauf der strukturellen Ausbildung des synkarpen Gynäzeums, im Fruchtknoten öfters auftretenden, kongenitalen und postgenitalen Verwachsungen in Zusammenhang gebracht.

Die Ergebnisse der histogenetischen Untersuchungen welche MCCOY [18] an im Wachstum begriffenen Blätter und Blüten von *Frasera carolinensis* durchführte, haben die »foliare Theorie« gleichfalls bestätigt; diese seine Befunde beweisen nämlich, daß bei der erwähnten Pflanze die Ausbildung der Blatt- bzw. Blütenorgane in ähnlicher Weise vor sich geht, woraus sowohl auf eine Homologie von Blüten und Laubblättern, wie auf die Blattbürtigkeit der Karpelle zu folgern ist.

In jüngster Zeit befaßte sich SÁRKÁNY [22] eingehend mit dem Entwicklungsgang des Gynäzeums bei den Umbelliferae, insbesondere bei *Foeniculum vulgare*. In Mittelpunkt seiner Untersuchungen steht das Problem des unverständigen Fruchtknotens, doch führte er Untersuchungen auch über den Leitbündelverlauf in jüngeren und vollentwickelten Blüten, bzw. im Fruchtknoten aus, und erbrachte einerseits mit den Ergebnissen dieser Studien, andererseits mit dem Nachweis der peltaten und plikaten Phase, weitere Beweise für die Blattbürtigkeit der Fruchtknoten der Umbelliferae.

Gegenüber den die foliare Theorie unterstützenden Ergebnissen, weisen einige Angaben auf den axillaren Ursprung des Fruchtknotens hin. BROOKS [2] im Einklang mit GRÉGOIRE, kam zu Folgerungen, wonach zwischen der vegetativen und der reproduktiven Spitze ontogenetische Unterschiede beständen, den Karpellen der Blattcharakter abzusprechen wäre und letztere als Organe »sui generis« betrachtet werden müßten.

BARNARD [zit. 36] kommt für Gramineen, Cyperaceen und Juncaceen zu dem Schluß, »daß die Stamina auf Grund ihrer Histogenese Achsennatur aufweisen müßten, und zwar deshalb, weil bei ihrer Ausgliederung am Blütenvegetationspunkt, im Gegensatz zu den übrigen Organen, Corpusgewebe beteiligt seien und die äußere Tunica-Lage keinerlei periklinare Teilungen aufweise«. Abgesehen davon, daß andere Autoren (z. B. SCHULTZE-MORTEL, für Cyperaceen, [zit. 36]) solche Unterschiede nicht feststellen konnten, besitzen BARNARD's Feststellungen keinen ausschlaggebenden Wert, da bei der Bildung der Blattanlage im Vegetationspunkt die ersten Teilungen bestimmt nicht immer einheitlich vor sich gehen [zit. 36].

Ansonsten ist BARNARD zur Erkenntnis gelangt, daß die Samenanlagen aller von ihm untersuchten Pflanzentypen achsenbürtig seien.

Auch ECKHARDT [zit. 36] hat sich mit diesem Problem eingehend befaßt und fand, daß abgesehen von wenigen Fällen von einer Stachysporie keine Rede sein kann. Innerhalb der Familien der Helobiae, Polycarpiae und Centrospermae konnte er die Blattnatur der Samenanlagen einwandfrei beweisen.

Aus Obigem geht hervor, daß trotz weiterverzweigten und sorgfältigen Prüfungen, trotz verschiedenen Theorien, die Frage nach dem Aufbau des Fruchtknotens bis zum heutigen Tag noch nicht als endgültig gelöst angesprochen werden kann. Hiezu sei noch bemerkt, daß in gewissen Fällen, sogar bei zu derselben Familie gehörenden Pflanzen, stark abweichende Ansichten über den Entwicklungsgang des Gynäzeums herrschen. Dies gilt beispielsweise auch hinsichtlich der Familie der Solanaceen. Obwohl mehrere Forscher eine große Anzahl der hierzu gehörenden Gattungen untersucht haben, erwiesen sich die die Fruchtknoten betreffenden Folgerungen in vielen Fällen recht unterschiedlich. Diese Tatsache hat mit zu unserem Entschluß beigetragen, die Fruchtknotenausbildung bei *Datura stramonium* L. einer eingehenden Untersuchung zu unterwerfen. Da wir uns mit *Datura stramonium* schon früher aus anderen Gesichtspunkten befaßt haben [23, 24], lag es auf der Hand, unsere histogenetischen Beobachtungen an dieser Gattung durchzuführen und dadurch unsere Kenntnisse über diese Pflanze auch in einer anderen Richtung zu erweitern.

### Kurze Zusammenfassung der Fachliteratur

Der Fruchtknotenbildung der Solanaceen wurden schon mehrere Arbeiten gewidmet. Vor allem soll die auf diesem Gebiet entwickelte Tätigkeit von BUCHENAU [3] und PAYER [20] erwähnt werden. Beide Autoren erklären sich für die Blattbürtigkeit des Fruchtknotens, wobei sie jedoch bezüglich der Scheidewände deren axialen Ursprung betonen, und behaupten, die Fachbildung wäre auf eine Aushöhlung der Axe zurückzuführen. Ihrer Ansicht nach ist die Plazenta gleichfalls ein Achsengebilde.

SCHÄFER [28] hat seinerseits auch eingehende Studien an *Nicotiana rustica*

*tica* und *Atropa belladonna* ausgeführt, doch unterläßt er für die erwähnte Gestaltungsart entwicklungslehrliche Beweise zu unterbreiten. Wäre, seiner Ansicht nach, die Plazenta achsenbürtig, müßte auf Längsschnitten des jungen Gynäzeums die Scheidewand als verlängerte Spitze der Blütenachse erscheinen; andererseits müßte auch »entwicklungsgeschichtlich eine Teilung dieses Achsenendes in 2 Hälften nachweisbar sein, will man nicht zu dem Ausfluchtsmittel greifen, nur den unteren Teil als Achsengebilde zu betrachten, den oberen dagegen als eingeschlagene und verwachsene Fruchtblattränder«. SCHÄFER meint, daß den Gynäzeum an der reproduktiven Spitze aus zwei schildförmigen Karpellen entsteht, »welche zu ihrer Ausbildung das Gewebe des Vegetationspunktes vollständig verbraucht haben«. Seiner Ansicht nach sind in der Familie der Solanaceen die Scheidewände des Fruchtknotens wie auch die sich dort ausbildende Plazenten, gleichfalls foliaren Ursprunges und entstehen durch den schildförmigen Bau der Karpelle. Nicht die Aushöhlung der Achse, sondern das schlauchförmige Wachstum des Karpells bedingt das Entstehen der Scheidewände. Die bei der Entwicklung schildförmiger Blätter auftretenden »Anschwellungen der Blattränder« stoßen schließlich aneinander, ihre gemeinsame Ansatzstelle erhebt sich und hier bildet sich dann die Trennwand aus.

Auf Grund ihrer histogenetischen Untersuchungen kamen GRELOT [11] und VIDAL [zit. 19] zu einer annähernd identischen Auffassung, da beide den Fruchtknoten für blattbürtig, die Trennwand aber für ein bis zur Spitze des Ovariums hochwachsendes Achsengebilde hielten. GRELOT basierte seine Folgerungen, — wie VAN TIEGHEM — auf die Gestaltung der Nervatur, indem er zu dem Schluß gelangte, daß der Entwicklungsgang der Innervierung in der Achse und in der Trennwand übereinstimmend seien.

GOEBEL [9] hat sich mit der Familie der Solanaceen eingehend befaßt und stellte fest, daß die Scheidewand durch eine aus Karpell und Torus entstandene Doppelsäule gebildet ist. In der Spitzenregion des Ovariums schließen sich die Karpellen nach raschem Wachstum ab, während ihre seitlichen Teile die parietale Zone der Plazenta bilden. Danach soll der Achse in der Entwicklung des Ovariums keine wichtige Rolle zukommen.

KRÜGER [14] führte an mehreren Arten des Genus *Solanum* Untersuchungen durch, welche die Entwicklung des Fruchtknotens und der Plazenta und ferner die Fruchtreife zum Gegenstand hatten. Die Histogenese des Gynäzeums verfolgend, gelangte sie zu der Ansicht, daß die Fruchtknotenanlagen in der dritten Schicht des reproduktiven Vegetationskegels angelegt werden, ihre Entwicklung also der der Laubblätter bei den *Solanum*-Arten durchaus ähnlich ist, worüber LANGE [15] schon früher berichtete. Bei den Solaneen erfolgt, nach Krüger, die Anlegung der Plazenten meistens in der vierten, seltener in der dritten Zellschicht und es sei auch nicht gänzlich auszuschließen, daß bei einigen Gattungen die vierte Zellschicht durch Teilung der Dritten Zustande käme.

SATINA und BLAKESLEE [25] stellten periklinale Chimaeren in *Datura stramonium* her, um die Entstehung des generativen (reproduktiven) Vegetationskegels, sowie des Fruchtknotens, an polyploiden Zellschichten verfolgen zu können und berichten über die Ergebnisse, zu welchen sie durch einen Vergleich mit ihren früheren Beobachtungen am Laubblatt, Perianth und Staubblatt von *Datura stramonium* hinsichtlich der Anlegung und Entwicklung dieser Organe gelangten [26]. Die Fruchtknotenanlagen von *Datura stramonium* sollen in der Keimschicht (germ-layer) L. III. (dritte Schicht) angelegt werden, durch periklinalen Teilungen, welche sich später auch in der Lage L. II. fortsetzen. Die Teilung der dritten Keimschicht spricht dafür, daß sowohl der Fruchtknoten, wie auch das Staubblatt, Achsenbildungen seien, im Gegensatz zu dem Laubblatt, welches sich, wie aus den Untersuchungen hervorgeht, in der zweiten Keimschicht (Tunica II) initiiert. Die Karpellanlagen nehmen bei fortschreitender Entwicklung die Form von zweier offenen Hufeisen an, zwischen welchen die echte Trennwand allmählich emporwächst. Aus der echten Trennwand zweigen sich, in Richtung des dorsalen Teiles der Karpelle, Scheintrennwände ab, wodurch die vier Fächer gebildet werden. Die Abzweigung der Trennwand läßt, in Richtung der Fruchtknotenspitze hin, allmählich nach, sodaß in dieser Region der Fruchtknoten nur noch zweifächerig erscheint.

MURRAY [19] untersuchte 15, zu der Familie der Solanaceen gehörende Gattungen und kam im Hinblick auf deren Verwandtschaftsbeziehungen zu phyletischen Folgerungen. Ihre, die Gestaltung des Fruchtknotens betreffende Feststellungen basierte sie hauptsächlich auf den Leitbündelverlauf. Ihrer Ansicht nach ist der Fruchtknoten achsenbürtig, da seine adaxialen Leitbündel amphicibrinal sind und sich nach der Art von Spurstränge in das Leitungsgewebe des Torus einfügen. Demgegenüber hält sie das zentrale, parenchymatische Gewebe der Scheidewand für eine Verlängerung der Achse, die äußere, die Achse bekleidende und die Plazenten tragende Geweberegion aber für entschieden blattbürtig. Mit ihrer dualistischen Konzeption hinsichtlich der Beurteilung der Scheidewand, steht sie der appendikulären Theorie DE CANDOLLE's nahe. Das Entstehen der Scheintrennwand bei *Datura stramonium* wäre dem Streckenwachstum der Karpellgewebe in Richtung der Plazenta hin zuzuschreiben. Die Anordnung der Plazenten soll nach MURRAY als axillär, ihr Ursprung als foliar gedeutet werden.

Aus all dem Vorstehenden geht hervor, daß der Fruchtknoten von *Datura* als ein synkarper Fruchtknoten, in welchem eine echte Scheidewand durchgeht, bezeichnet werden kann; die vierfächige Ausbildung im unteren Teil des Fruchtknotens wird durch das Entstehen einer Scheintrennwand bewirkt [9, 19, 25]. WETTSTEIN [38] beschreibt die Plazentation von *Datura* als axillär-angulär.

## Material und Methode

Wir begannen unsere Studien über die Gestaltungsphasen des Fruchtknotens von *Datura* mit dem Einsammeln des ungefähr 2 mm großen reproduktiven Vegetationsspitze. Von diesem Entwicklungsstadium wurde das Material bis zur Entfaltung der Blüten, fortlaufend eingesammelt, in Carnoy II fixiert, dann auf die übliche Weise in Paraffin eingebettet und zu Serienschnitten aufgearbeitet. Zur Färbung der 15  $\mu$  dünnen Schnitte wurde die Doppel-färbemethode Bismarckbraun-Malachitgrün verwendet [21].

Neben unseren cytologischen und histogenetischen Untersuchungen verfolgten wir im Stereomikroskop, auch die einzelnen morphologischen Phasen der Fruchtknotengestaltung. Dies ermöglichte uns, aus in drei Richtungen parallel durchgeführten Beobachtungen, unsere Schlüsse zu ziehen.

In Hinsicht auf die Terminologie sei erwähnt, daß bezüglich der Zonation des reproduktiven Vegetationspunktes, wir die von SCHMIDT [20] herrührende Tunica-Corpus Bezeichnung verwendet haben, obwohl in jüngster Zeit die Richtigkeit der Tunica-Corpus Konzeption stark in Frage gestellt wurde und hauptsächlich für die Aufteilung des Vegetationskegels neue Benennungen vorgeschlagen worden sind [5, 12]. Es schien uns geboten, bei der Tunica-Corpus Konzeption zu bleiben, da diese Geweberegionen in *Datura* leicht zu unterscheiden sind; die Stellen also, wo die einzelnen Prozesse vor sich gehen, können gut abgegrenzt werden.

## Eingehende Beschreibung der Untersuchungen

### *Fruchtknotengestaltung*

Im reproduktiven Vegetationspunkt von *Datura stramonium* können nach dem Zusammenschließen der Sepala, nach dem Erscheinen der Petala- und Staubblattanlagen, in der zweiten Lage der zweireihigen Tunica, charakteristische Antikinalteilungen beobachtet werden. Im darauf folgenden Entwicklungsstadium treten in zwei entgegengesetzten Stellen des schon vollkommen abgeplatteten Vegetationspunktes periklinale Teilungen auf, welche schon die Anlegung der Karpelle andeuten (Abb. 1a). Es entstehen zwei sog. subapikale Initialgruppen, welche die erste Tunica-Schicht ein wenig nach Oben schiebend, sich zu gut ausnehmbaren Wülsten ausbilden. Zwischen den zwei Wülsten, in der Mitte, ebenfalls in der zweiten Tunica-Schicht, wird allmählich eine in Perikinalteilung begriffene, von uns basale Initialen genannte, Zellengruppe ersichtlich (Abb. 1b). Mit dem Erscheinen dieser basalen Initialzellen setzt die laterale Entwicklung des Karpells und die Bildung des später immer mehr tätigen Randmeristems ein.

Die subapikalen Initialen liefern durch rasche Teilungen ihre Deszendenten, welche im Verlauf der späteren Entwicklung, das Längewachstum der Karpellprimordien zur Folge haben. Die Deszendenten werden geteilt und liefern so das Grundmeristem des fortwährend wachsenden Karpellprimordiums.

Durch die Teilung der Basalinitialen wird der Grund des Fruchtknotenprimordiums angelegt und die Basis beider Wülste verbreitert sich. Mit dem in der verbreiterten Basis der Karpellanlagen einsetzenden Wachstum bildet sich die Querzone der Anlagen aus, welch letztere dann miteinander verwachsend, sich gleichzeitig zu strecken beginnen (Abb. 2); dieser Vorgang bedingt die schlauchförmige Gestaltung (Peltation) der Karpellprimordien. Im geschilder-

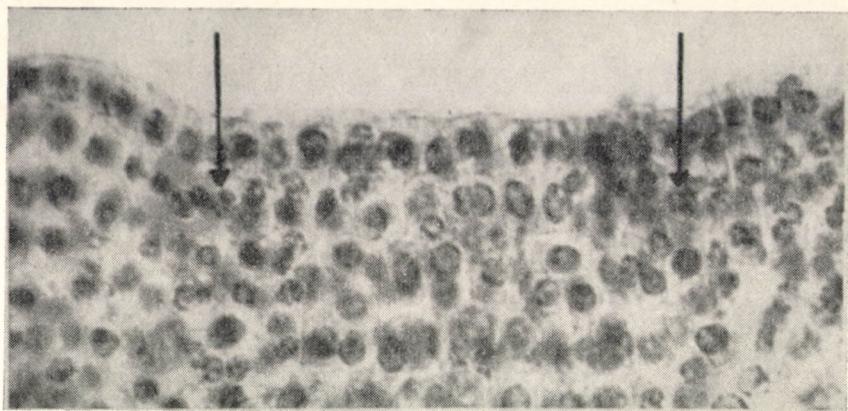


Abb. 1a. Anlegung der Karpelle (Obj. : Zeiss Apo. 40x, Oc. Leitz Periplan 10x)

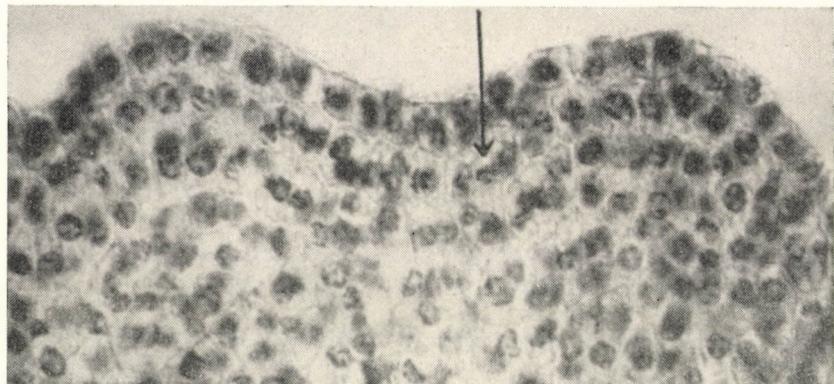


Abb. 1b. Anlegung der Querzone (Obj. : Zeiss Apo. 40x, Oc. Leitz Periplan 10x)

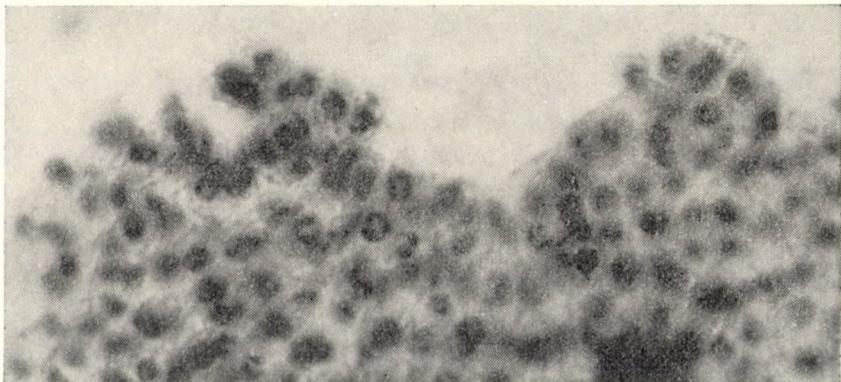


Abb. 2. Längsschnitt durch den Fruchtknoten in der peltaten Phase. (Obj. : Zeiss Apo. 40x, Oc. Leitz Periplan 10x)

ten Entwicklungsstadium ist die Fruchtknotenanlage zweifächerig, nach oben zu steht sie aber noch offen (Abb. 3).

Bald darauf beginnt die zweite Phase der Fruchtknotenbildung, charakterisiert durch das intensive, zentripetale Wachsen der Karpellränder in Richtung der Querzone hin (Abb. 4). Dieser Vorgang wird von der erneuerten Tätigkeit des schon früher aufgetretenen Randmeristem eingeleitet, insofern sich das zu Beginn des Entwicklungsprozesses nur an der Basis der Karpellanlagen bemerkbare Randmeristem im Laufe des Längenwachstums allmählich ver-

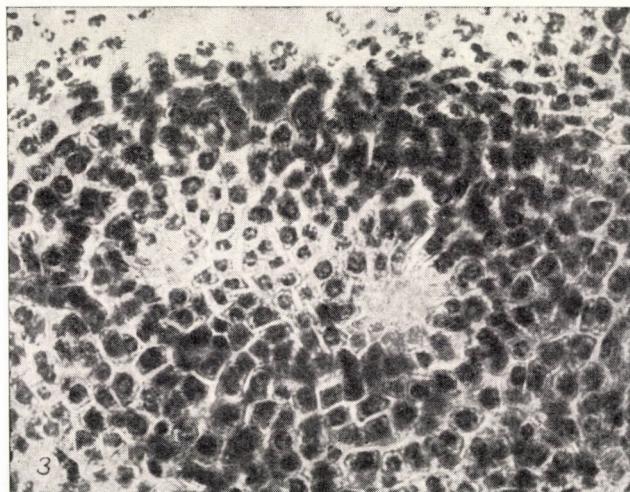


Abb. 3. Die im Verlauf der Peltation entstandenen zwei Fächer (Obj.: Zeiss Apo. 40×, Oc.: Leitz Periplan 10×)

breitert (Abb. 2). Sein eigenartiger Bildungsgang kann an den in der zweiten Protodermeschicht (Tunica) im Anfang nur zerstreut, später aber gruppenweise auftretenden periklinen Teilungen leicht verfolgt werden. Die sich stets steigernde Aktivität des Randmeristems fördert ein ebenfalls intensives, zentripetales Wachstum, infolgedessen überwölben die Karpellränder die Querzone, wachsen später dort an und schlagen sich allmählich ein. Bei fortschreitender Plikation wird die peltate Zone unterdrückt und im etwas älteren Fruchtknotenprimordium ist schon die plikate Zone vorherrschend (Plikation, Abb. 5).

Die Weiterentwicklung der Plikation lässt sich am besten an etwas älteren Fruchtknotenanlagen verfolgen. Durch postgenitale Verwachsung, welche sich als Fortsetzung der Querzone, an der abaxialen Seite der Karpellränder bemerkbar macht, wird die sog. echte Scheidewand, der wir im Folgenden den Namen »primäre Scheidewand« beilegen, gebildet. Die Plikation der freistehenden Karpellränder setzt sich senkrecht auf die primäre Scheidewand und im gleichen Rhythmus fort: sich allmählich verschmelzend erreichen die Karpell-

ränder, entlang der Ansatzstelle des Hauptnerves, die adaxiale Wand des Fruchtknotens, auf welche sie dann anwachsen. Es entsteht so der vierfache-  
rige Bau des Fruchtknotens (Abb. 6 und 7). Die postgenitale Verwachsung der Karpellränder ist an letzteren Abbildungen gut ersichtlich.

Als Ergebnis unserer Untersuchung ergibt sich somit, daß, da die Ausbildung der sog. Scheintrennwand auf die geschilderte Weise vor sich geht, diese von uns als blattbürtig und als sekundäre Scheidewand gedeutet wird.

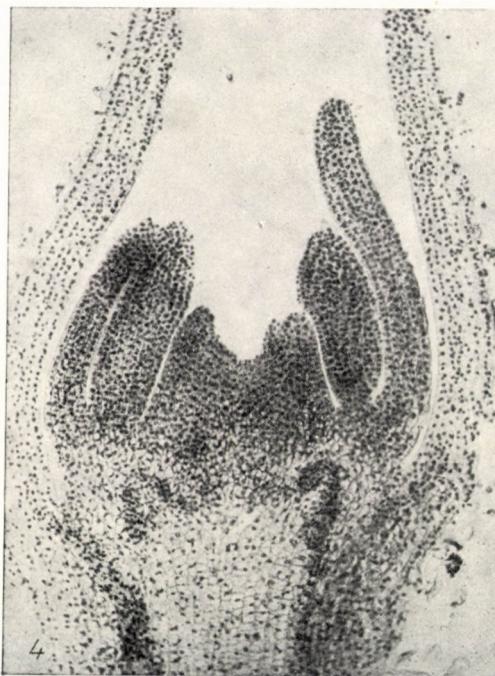


Abb. 4. Längsschnitt durch den Fruchtknoten bei Beendigung der peltaten Phase  
(Obj.: Zeiss Apo. 40×, Oc: Leitz Periplan 10×)

Während der Ausbildung des Grundes sind die Dorsalabschnitte der Karpelle in starkem Wachstum begriffen und stoßen allmählich aneinander. Gleichzeitig setzt auch das Längewachstum der Scheidewände ein. Die Entwicklung der primären Scheidewand geht intensiver vor sich und zu der Zeit, wo sich der Fruchtknoten verschließt, hat sie die Achsen spitze erreicht (Abb. 8). Demgegenüber wächst die sekundäre Scheidewand nur bis zu dem oberen Drittel des Fruchtknotens empor. Die Plikation ist nämlich in dieser Region geringer, infolgedessen tritt sie mit der adaxialen Seite des Fruchtknotens nicht mehr in Berührung, während in den noch höheren Regionen sie sich von der primären Scheidewand vollkommen zurückzieht, wodurch der vierfächige Fruchtkno-  
ten hier zweifächerig erscheint (Abb. 9 bis 14).

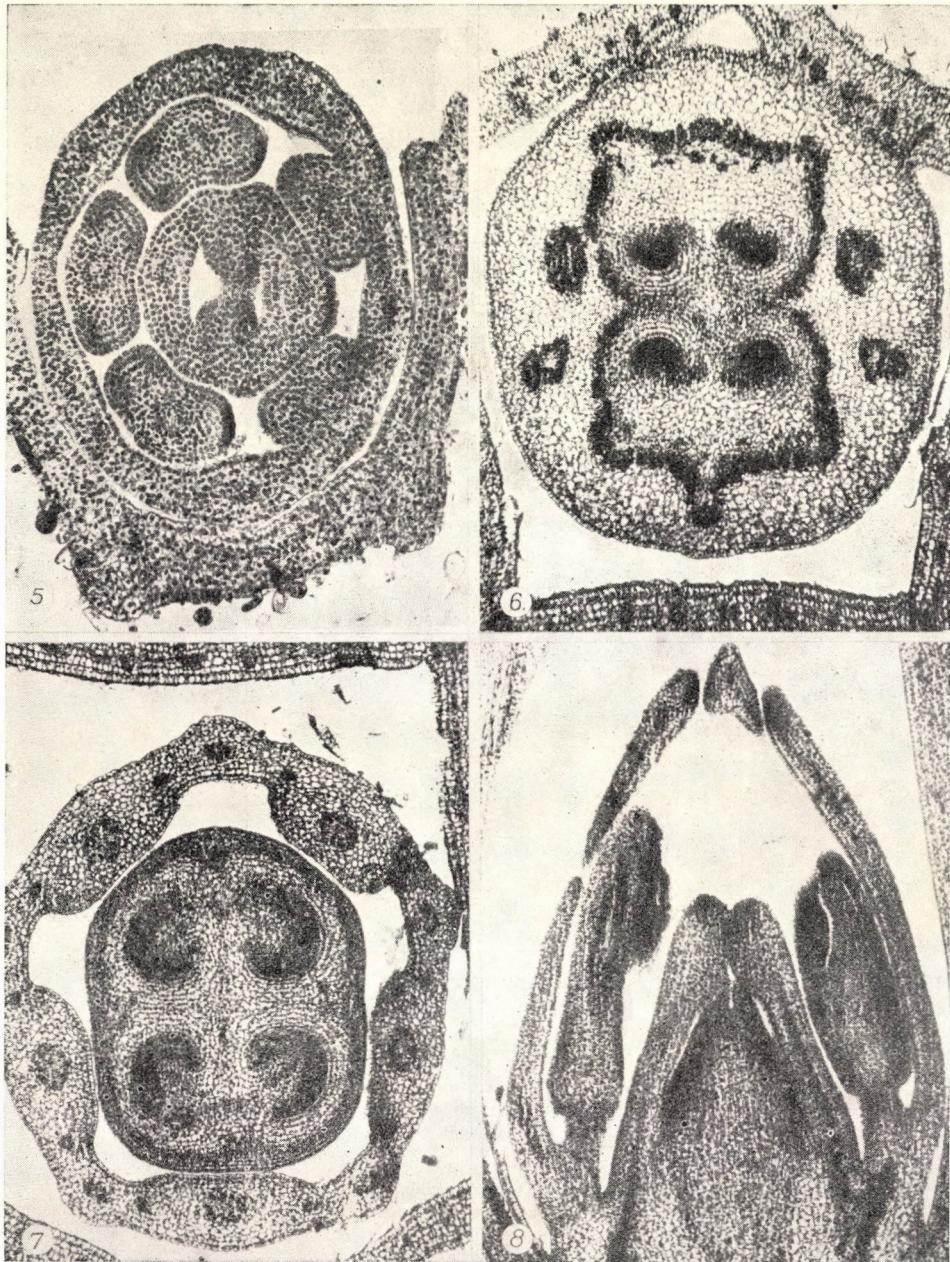


Abb. 5. Beginn der Plikatphase (Obj.: Zeiss Apo. 40×, Oc: Leitz Periplan 10×)

Abb. 6. Ausbildung der primären Scheidewand (Obj.: Zeiss Apo. 20×, Oc: Leitz Periplan 10×)

Abb. 7. Ausbildung der sekundären Scheidewand (Obj.: Zeiss Apo. 20×, Oc.: Leitz Periplan 10×)

Abb. 8. Verschließen des Fruchtknotens (Obj.: Zeiss Apo. 20×, Oc: Leitz Periplan 10×)

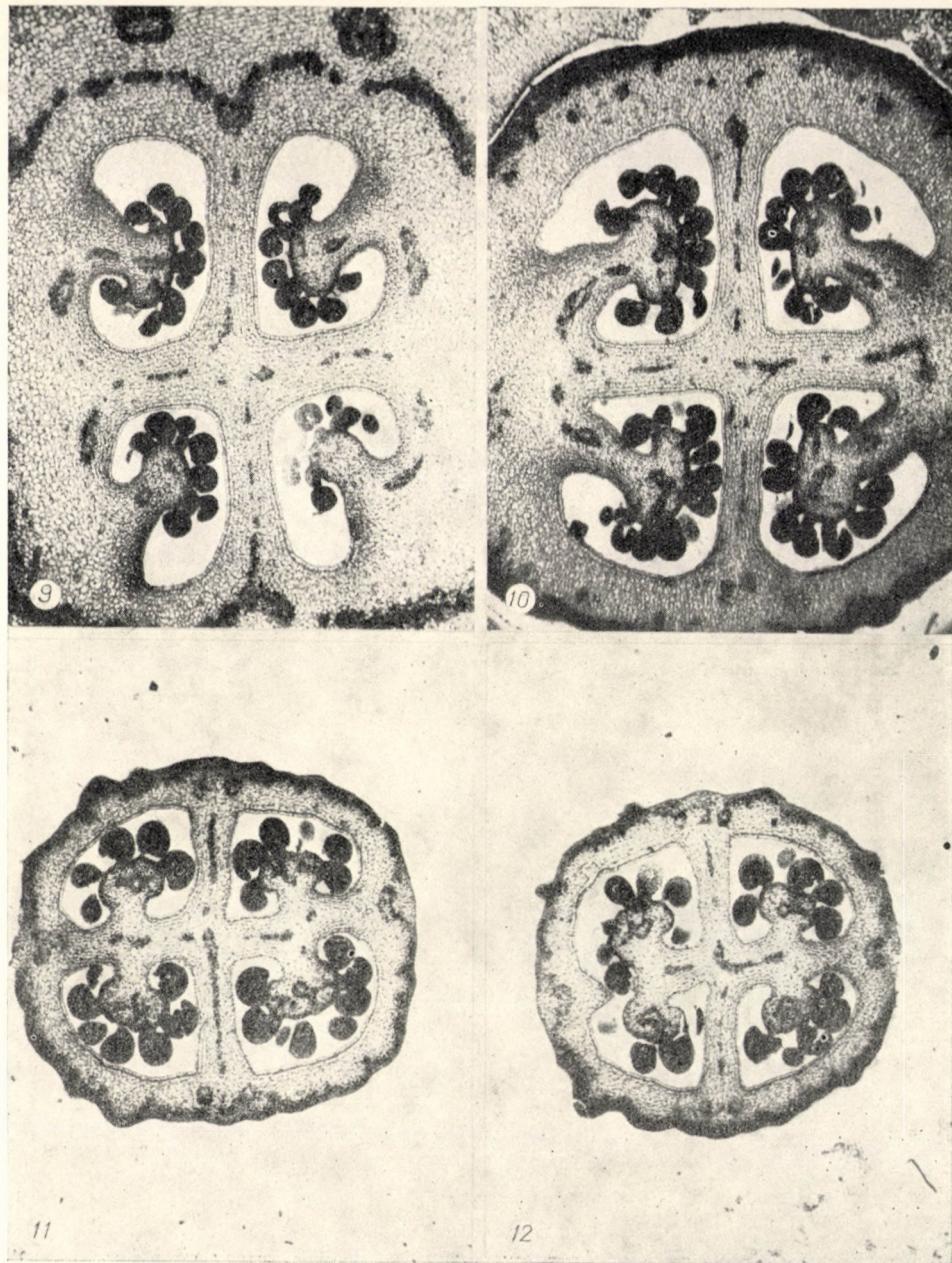
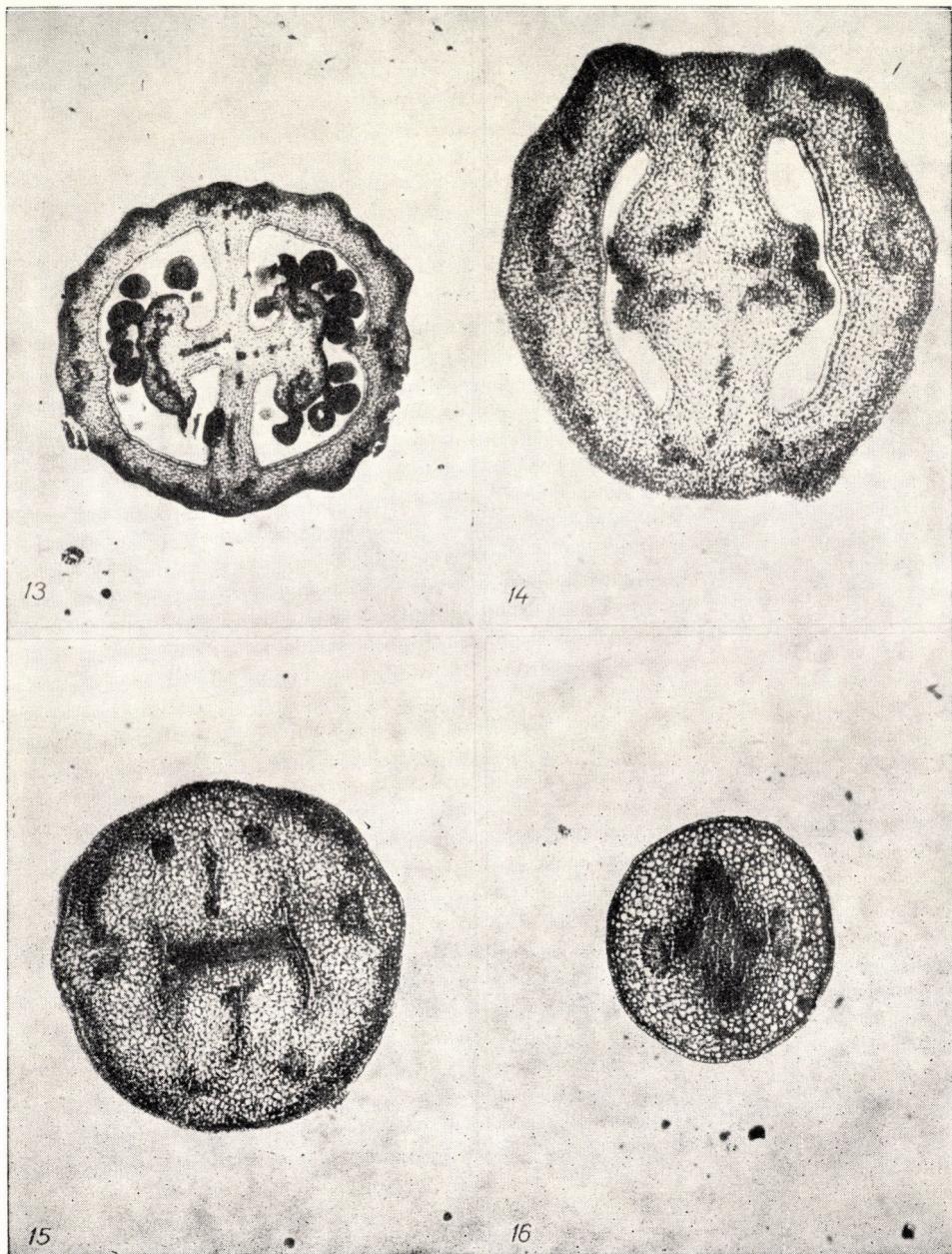


Abb. 9. Beendigung der Plikation; auf die dorsale Fruchtknotenwand angewachsene Plazenten  
(Obj.: Zeiss Apo. 20 $\times$ , Oc: Leitz Periplan 10 $\times$ )

Abb. 10. Auflockerung der Plikation; Beginn der Plazentenwanderung (Obj.: Zeiss Apo. 20 $\times$ ,  
Oc.: Leitz Periplan 10 $\times$ )

Abb. 11. Von der Dorsalwand des Fruchtknotens an die sich zurückziehenden sekundären  
Scheidewände überwanderte Plazenten (Obj.: Zeiss Apo. 20 $\times$ , Oc.: Leitz Periplan 10 $\times$ )

Abb. 12. Trennung der Fruchtknotenwand und der sekundären Scheidewand (Obj.: Zeiss Apo.  
20 $\times$ , Oc.: Leitz Periplan 10 $\times$ )



*Abb. 13. Verschmelzen der Plazenten (Obj.: Zeiss Apo. 20×, Oc.: Leitz Periplan 10×)*  
*Abb. 14. Zurücktreten der sekundären Scheidewand, Verschwinden der Plazenta (Obj.: Zeiss Apo. 40×, Oc.: Leitz Periplan 10×)*  
*Abb. 15. Beginn des Zurücktretens der primären Scheidewand (Obj.: Zeiss Apo. 40×, Oc.: Leitz Periplan 10×)*  
*Abb. 16. Einfächerige Zone des Fruchtknotens mit pollenhörendem Gewebe (Obj.: Zeiss Apo. 40×, Oc.: Leitz Periplan 10×)*

Im oberen Teil des Fruchtknotens nimmt die Plikation immer mehr ab und wo die primäre Scheidewand bildenden zwei Karpellränder sich trennen (Abb. 15), liegt die einfächerige Zone des Fruchtknotens, bzw. die Basis des Griffels. Das hier ausgebildete einzige Fach ist etwas höher mit pollenführendem Gewebe abgeschlossen (Abb. 16).

### Plazentation

In jenem Stadium der Entwicklung, wo im Verlauf der Plikation die sekundäre Scheidewand angelegt wird, erscheint am Rand der Karpelle, an ihrer adaxialen Seite, ein sich dunkler färbendes Gewebe, dessen Ausbildung Periklinalteilungen in der zweiten und dritten Protodermschicht vorangehen. Es handelt sich um ein Meristem, welches bei fortschreitender Entwicklung die Plazenta bildet.

Die Anlegung der Plazenten erfolgt gleichzeitig mit dem schon erwähnten, charakteristischen Einschlagen der Karpellränder und demgemäß ändert sich ihre Ansatzstelle nach den verschiedenen Zonen des Fruchtknotens (Abb. 6 und 7). Diese Änderung offenbart sich darin, daß im unteren Teil, also in der Zone der stärksten Plikation, die Plazentation in allen vier Fruchtknotenfächern ihren Ursprung scheinbar aus der adaxialen Wand nimmt, während sie im mittleren Drittel, im großen und ganzen, auf die sekundäre Scheidewand verlegt wird. Noch höher, im Gebiet wo die Plikation geringer ist, und die sekundäre Scheidewand allmählich aufhört, also im zweifächerigen Teil des Fruchtknotens, zieht sich die Plazenta beinahe bis zu der primären Scheidewand zurück. Nach der Spitze zu ist eine »sterile Zone« bemerkbar, und zuletzt in der einfächerigen Region fehlt die Plazenta vollkommen. Der hier nur kurz geschilderte Bildungsgang läßt sich am besten in jenem Stadium der Fruchtknotenentwicklung verfolgen, wo sich auch die Samenanlagen schon ausgebildet haben (Abb. 9 bis 14). Diese Untersuchungen bestätigen daher die Annahme, daß die Plazenta im Verlauf der Fruchtknotenbildung am Rand der Karpellprimordien auftritt, letzten Endes also samt den Samenanlagen, als blattbürtig aufgefaßt werden soll. Andererseits, die Plazentenbildung von *Datura stramonium* kann, in Anbetracht der Plikation der Karpelle, als marginal bezeichnet werden. Mit dem allmählichen Verschwinden der sekundären Scheidewand scheint die Plazentenbildung sich zentral-angulär zu gestalten.

### Besprechung

Unsere über die Histogenese des Fruchtknotens von *Datura stramonium* durchgeföhrten Studien lassen darauf folgern, daß es sich in diesem Falle um eine Ausbildung foliaren Ursprungs handle, das heißt, um die kongenitale,

später postgenitale Verwachsung von Karpellen, die mit Blättern homolog sind.

Das Entstehen des Fruchtknotens aus der zweiten Tunica-Schicht, wie das auch im Entwicklungsgang der Laubblattspreite [20, 38] sich ausbildende Randmeristem, weisen unserer Ansicht nach mit genügend Sicherheit darauf hin, daß die Organprimordien, welche den Aufbau des Gynäzeums von *Datura stramonium* bedingen, keinesfalls als achsenbürtige Körperteile aufgefaßt werden können, sondern auf Grund ihrer primären Histogenese als dem Blatt homologe Bildungen zu betrachten seien.

Die Weiterentwicklung der Fruchtknotenanlagen, ihre Verwachsung, das Auftreten der für die schildförmigen Laubblätter charakteristischen, gut abgesonderten peltaten bzw. plikaten Zonen lassen ebenfalls auf ein Entstehen aus dem Blatt schließen.

Danach stehen unsere Untersuchungsergebnisse keinesfalls im Einklang mit den Folgerungen von SATINA und BLAKESLEE [25], nach welchen der Fruchtknoten von *Datura stramonium* gänzlich als achsenbürtiges Organ gedeutet wird. Die erwähnten Autoren basieren ihre Feststellung auf den Befund, daß in der Fruchtknotenbildung von *Datura* die ersten periklinen Teilungen in einer tieferen Lage des reproduktiven Kegels — in der dritten »Keimschicht« oder Corpus — vor sich gehen, während bei den Laubblättern und den übrigen Blütenblättern die anfänglichen Perikinalteilungen in der zweiten »Keimschicht« nachzuweisen sind [26]. Demgegenüber konnten wir die ersten Perikinalteilungen in einem früheren Stadium beobachten, als die erwähnten Autoren es beschrieben hatten, nämlich vor der Anlegung der Carpellwülsten, und zwar gerade in der zweiten Tunicaschicht.

Unabhängig von diesen Ergebnissen konnten wir auch im Corpus früh auftretende unregelmäßige Teilungen beobachten, die schon vor der Ausbildung der Fruchtknotenanlage ersichtlich waren, deshalb nur als eine meristatische Tätigkeit der reproduktiven Spitze aufgefaßt werden können und mit der Anlegung des Fruchtknotens in keinerlei Beziehung stehen. Im Einklang mit McCoy [20] sind wir der Ansicht, daß es sich hier um ein geringes, internodiales Wachstum handle.

Ferner berichten SATINA und BLAKESLEE [25] über Teilungen, die sich in der dritten Zellschicht der Fruchtknotenanlagen bemerkbar machen und welche, laut unserer Meinung, die Ausbildung des Randmeristems, bzw. des Karpellmesophylls — wie es auch bei den Laubblättern der Fall ist — einleiten [6, 27].

Die späteren Perikinalteilungen der zweiten »Keimschicht«, wie dies SATINA und BLAKESLEE [25] ebenfalls erwähnen, bringen den Beweis für die Ausbildung des Randmeristems, was zweifelsohne für das Laubblatt charakteristisch ist.

Weder die obenerwähnten Autoren, noch MURRAY [19] haben sich mit der peltaten und plikaten Entwicklung der Karpellen befaßt, beziehungsweise

ließen sie den Bildungsgang dieser Zonen außer Acht. Unsere Befunde hinsichtlich der plikaten und peltaten Zonation bestätigen den ausgesprochenen Blattcharakter des *Datura*-Fruchtknotens, um so mehr als die Sprossachse keine derartige Ausbildung aufweisen kann.

Auf die Entwicklung der Innervierung basierend, kommt MURRAY [19] zum Schluß, daß der Fruchtknoten der zu den Solanaceen gehörenden Gattungen, und demzufolge auch jener von *Datura stramonium*, blattbürtige Organe seien und nur der zentrale, parenchymatische Abschnitt des Fruchtknotens wird von ihr als achsenbürtig gedeutet, da sie den Blattcharakter des letzteren nicht nachweisen konnte.

Unsere Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Ausbildung des in Frage stehenden zentralen Abschnittes keinesfalls der Einkeilung der Achse zwischen den zwei Karpellen, sondern der frühzeitigen kongenitalen und postgenitalen Verwachsung der Karpellränder zuzuschreiben ist. Da sich die kongenitale Verwachsung nur auf die unterdrückte peltate Zone beschränkt, dominiert im adulten Fruchtknoten die postgenitale Verwachsung der Plikatzone. Auf ähnliche, postgenitale Verwachsungen geht BAUM [1] im Zusammenhang mit seinen, an anderen Fruchtknotenarten durchgeführten Studien näher ein, und weist auf zahlreiche morphologische und histologische Abweichungen hin, die durch die postgenitalen Verwachsungen verursacht und dadurch diese Erscheinungen falsch gedeutet werden könnten.

Die Anlegung der Karpelle und ihre Weiterentwicklung spricht ebenfalls für ihre Blattnatur. Da wir die Mitwirkung tiefer liegender (axialer) Gewebe in der Ausbildung des Fruchtknotens nicht entdecken konnten, halten wir letzteren für ein Organ von homogenem Bau. Von dieser Anschauung ausgehend können wir, im Gegensatz zu PAYER [23], VIDAL [zit. 19], GRELOT [11] und SATINA und BLAKESLEE [25], die Plazenta nicht als Achsengebilde auffassen. Auf Grund unserer Forschungen müssen wir MURRAY's [19] Ansicht teilen, die aus der Innervierung auf die Blattnatur der Karpelle folgert und die Plazenta als einen dem Karpell entstandenem Auswuchs, demzufolge also als blattbürtig deutet.

Hinsichtlich der Plazentation können wir auch den Feststellungen von GOEBEL [10] nicht zustimmen, welcher von einer parietalen Plazentation spricht. Nach ihm soll sich die Plazenta am lateralen, sich intensiver entwickelndem Teil der Karpelle ausbilden.

Nach WETTSTEIN [38], der seine Schlüsse aus Untersuchungen über den adulten Fruchtknoten zog, soll die Plazentation bei den Solanaceen eine zentral-anguläre sein. MURRAY's [19] Studien über eine Anzahl von Solanaceen-Gattungen, ließen sie darauf schließen, daß die Plazentation, da sie in der Basis des Karpells ihren Ursprung nimmt, als axillär angesehen werden soll.

Die Erkenntnis, daß im Fruchtknoten von *Datura* eine plikate und eine peltate Zone vorhanden ist, bringt den Beweis, daß das Plazentengewebe am

eingeschlagenen Karpellrand auftritt und demzufolge die Plazentation, ontogenetisch gesehen, als marginal anzusprechen ist.

Dem mehr oder minder starken Einschlagen der Karpellränder gemäß, ändert auch die Plazenta ihre Lage im Fruchtknoten. Dadurch wird aber die Ontogenese der Plazenta nicht beeinflußt, und nur die morphologischen Verhältnisse des entwickelten Fruchtknotens ändern sich.

An dieser Stelle sei Herrn Professor SÁNDOR SÁRKÁNY für all die gebotene und unsere Arbeit erleichternde Hilfe bestens gedankt. Unser Dank gebührt auch der technischen Mitarbeiterin Frau KÓBORI, für die mikrotechnische Bearbeitung des Untersuchungsmaterials.

#### LITERATUR

1. BAUM, H. (1949) Der einheitliche Bauplan des Angiospermen-Gynoecium und die Homologie ihrer fertilen Abschnitten. *Österr. Bot. Zeitschr.*, **96**, 64—82.
2. BROOKS, R. N. (1940) Comparative histogenesis of vegetative and floral apices in *Amygdalus communis* with special reference to the carpel. *Hilgardia*, **13**, 249—299.
3. BUCHENAU, K. (1951) Beitrag zur Entwicklungsgeschichte des Pistills. Diss. Marburg.
4. CELAKOVSKÝ, I. (1876) Vergleichende Darstellung der Plazenta in den Fruchtknoten der Phanerogamen. *Prag.*
5. ESAU, H. (1953) Plant Anatomy. John Wiley, New York.
6. FOSTER, A. S. (1935) A histogenetic study of foliar determination in *Carya Buckleyi* var. *Arkansana*. *Amer. J. Bot.*, **22**, 98—115.
7. GOEBEL, K. (1880) Beiträge zur vergleichenden Entwicklungsgeschichte der Sporangien. *Bot. Ztg.*, **38**, 545—552.
8. GOEBEL, K. (1886) Vergleichende Entwicklungsgeschichte der Pflanzenorgane. In SCHENK Handb. d. Botanik, **3**, 382—430. E. Tredent, Breslau.
9. GOEBEL, K. (1923) Organographie der Pflanzen. **3**, Fischer, Jena.
10. GREGOIRE, V. (1931) La valeur morphologique des carpelles dans les Angiospermes. *Bull. Acad. Roy. Belgique*, Ser. 5, **17**, 1286—1302.
11. GRELOT, P. (1897) Recherches sur le système liberoligneaux floral: Gamopétales bicarpellées. *Ann. Sci. Nat. Sér. VIII. Bot.*, **5**, 1—154.
12. GUTTENBERG, H. (1955) Lehrbuch der allgemeinen Botanik. Akademie-Verlag, Berlin.
13. HOFMEISTER, W. (1951) Vergleichende Untersuchungen der Keimung, Entfaltung und Fruchtbildung höherer Kryptogamen. W. Engelmann, Leipzig.
14. KRÜGER, M. (1932) Vergleichende entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an den Fruchtknoten und Früchten zweier Solanumchimären und ihrer Elterarten. *Planta*, **17**, 372—435.
15. LANGE, F. (1926) Vergleichende Untersuchung über die Blattentwicklung einiger Solanumchimären und ihrer Elterarten. *Planta*, **3**, 181—282.
16. LEINFELLNER, W. (1941) Über den unterständigen Fruchtknoten und einige Bemerkungen über den Bauplan des verwachsungsblättrigen Gynoeciums an sich. *Bot. Archiv.*, **42**, 1—9.
17. LEINFELLNER, W. (1950) Der Bauplan des syncarpen Gynoeciums. *Österr. Bot. Zeitschr.*, **97**, 403—436.
18. MCCOY, R. W. (1940) Floral organogenesis in *Frasera carolinensis*. *Amer. J. Botany*, **27**, 600—609.
19. MURRAY, M. A. (1945) Carpillary and placental structure in the Solanaceae. *Botanical Gazette*, **106**, 243—260.
20. PAYER, B. (1857) Traité d'organogénie comparée de la fleur. Paris.
21. SÁRKÁNY, S.—SZALAI, I. (1957) Növénytani praktikum I. Botanisches Praktikum I. Tan-könyvkiadó, Budapest. (Ungarisch.)
22. SÁRKÁNY, S. (1959) Histogenesis of the flower in the Umbelliferae and the so-called "inferior" ovary. X. Internat. Botanical Congress II. Abstracts, 342—343. Montreal.
23. SÁRKÁNY, S.—VERZÁR-PETRI, G. (1956) Az állományosrúség hatása a *Datura metel* L. fejlődésére és alkaloidtartalmára. Einfluß der Standdichte auf die Entwicklung und den Alkaloidengehalt bei *Datura metel* L. *Acta Pharm. Hung.*, **2**, 81—93. (Ungarisch.)

24. SÁRKÁNY, S.—VERZÁR-PETRI, G. (1957) Megjegyzések a hazai termesztésű *Datura „metel”* L. szisztematikai értékeléséhez. Einige Bemerkungen zur systematischen Bewertung der in Ungarn gezüchteten *Datura „metel“* L. *Gyógyszerészeti*, **11—12**, 251—253. (Ungarisch.)
25. SATINA, S.—BLAKESLEE, A. F. (1943) Periclinal chimeras in *Datura* in relation to the development of the carpel. *Am. J. Bot.*, **30**, 453—463.
26. SATINA, S.—BLAKESLEE, A. F. (1941) Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower. *Am. J. Bot.*, **28**, 862—871.
27. SCHNEIDER, R. (1952) Histogenetische Untersuchungen über den Bau der Laubblätter insbesondere ihres Mesophylls. *Österr. Bot. Zeitschr.*, **99**, 253—285.
28. SCHÄFER, B. (1890) Beitrag zur Entwicklungsgeschichte des Fruchtblattes und der Plazenta. *Flora*, **73**, 62—104.
29. SCHMIDT, A. (1924) Histologische Studien an phanerogamen Vegetationspunkten. *Bot. Arch.*, **8**, 345—404.
30. SPROTTE, F. (1940) Untersuchungen über Wachstum und Nervatur der Fruchtblätter. *Bot. Arch.*, **40**, 463—506.
31. STRASBURGER, E. (1879) Die Angiospermen und die Gymnospermen. Fischer, Jena.
32. VAN TIEGHEM, P. (1868) Recherches sur la structure du pistil. *Ann. Sci. Nat. Sér. V. Bot.*, **9**, 127—226.
33. TROLL, W. (1928) Zur Auffassung des paracarpfen Gynoeciums und des coenocarpfen Gynoeciums überhaupt. *Planta*, **6**, 255—276.
34. TROLL, W. (1932) Morphologie der schildförmigen Blätter, *Planta*, **17**, 64—82.
35. TROLL, W. (1939) Die morphologische Natur der Karpelle, *Chron. Bot.*, **5**, 38—41.
36. TROLL, W. (1959) Fortschritte der Botanik. **21**, 26. Springer, Berlin—Göttingen—Heidelberg.
37. WARMING, E. (1878) De l'ovule. *Ann. Sci. Nat. Sér. VI. Bot.*, **5**, 177—266.
38. WETTSTEIN, R. (1911) Handbuch der systematischen Botanik. Deutcke. Leipzig—Wien. 721—724.
39. WINKLER, H. (1935) Chimeren und Burdonen. *Die Biologie*, **9**, 279—290.

#### ORGANIZATION OF THE PISTILLARY REGION IN DATURA STRAMONIUM L.

Literature contains contradictory reports on the organization of the pistil inasmuch as some authors regard this ovule-bearing organ as being of axillary, others as of foliar origin.

The authors have chosen the plant *Datura stramonium* L. on which to study the origin and development of the pistil, because several authors have studied the pistil of Solanaceae — of *Datura stramonium* in particular — and arrived at contradictory conclusions.

The authors followed the ontogeny of the plant from its earliest age to efflorescence and observed the development of the pistil from histological point of view by means of serial sections, and from a morphological point of view by means of the stereomicroscope.

The results of these observations show the pistil of the plant *Datura stramonium* to be undoubtedly of foliar origin.

Pistillary protuberances arise in the second tunica of the growing point where the so-called subapical cell group, produced by periclinal division, continues to divide in a manner similar to the process observed in foliage leaves.

Two phases can be distinguished in the development of the pistil: 1. the peltate phase which characterizes the initial period of evolution, 2. the plicate phase which becomes predominant in the later stage of pistillary organization. Plication gives rise to primary septa which process is followed by the formation of secondary septa due to a further curling of the edges of the carpellary leaves. Therefore, the secondary septum is no pseudoseptum as usually described in morphological reports.

In consideration of the histogeny of the pistil, the placentation is, according to our observations, a marginal one.

#### ДАННЫЕ К ФОРМИРОВАНИЮ ГИНЕЦЕЯ DATURA STRAMONIUM L.

Согласно исследованиям авторов, проведенным в связи с данными литературы о формировании пестика, до сегодняшнего дня нельзя считать этот вопрос разрешенным, так как имеются результаты исследований, говорящие как за пазушную (*axillaris*) так и за листовую природу пестика.

Для подробного изучения происхождения и дальнейшего развития пестика авторы выбрали *Datura stramonium L.*, между прочим по той причине, что согласно литературным данным уже несколько авторов занималось вопросом образования пестика семейства Solanaceae и в пределах последнего с *Datura stramonium*, однако, они пришли к противоречивым установлениям.

Авторы проводили свои наблюдения начиная с воспроизводительной почки величиной 2 мм до раскрытия цветка, и исследовали вопрос образования пестика от части с гистогенетической точки зрения на сериях срезов, а от части на основании эволюционно-морфологических фаз (в стереомикроскопе).

На основе результатов исследований авторы — в противоположность господствующим до сих пор воззрениям — того мнения, что пестик *Datura stramonium L.* всецело листового происхождения.

Завязи возникают во втором слое стенки воспроизводительной почки, где образовавшаяся вследствие периклинальных делений так наз. субапикальная клеточная группа дальше делится, подобно процессу, наблюдаемому в случае настоящих листьев.

В развитии пестика можно различать две фазы: первая фаза наблюдается в начале образования пестика, и представляет пельватную фазу, которая в позднейшем становится угнетенной, в то время как вторая фаза представляет господствующую в ходе дальнейшей организации пестика пликатную фазу. Пликация обусловливает первичную перегородку, после чего следует образование, организующейся путем дальнейшего заворачивания края плодолистников, вторичной перегородки. Значит вторичную перегородку нельзя рассматривать ложной перегородкой, как это определялось в появившихся до сих пор морфологических описаниях.

Ввиду гистогенеза пестика можно плацентацию завязи согласно результатам исследования рассматривать краевой.

Gizella VERZÁR-PETRI

Gabriella BARANYAI-SZENTPÉTERY

Budapest, VIII. Múzeum krt. 4/a. Ungarn

# THE ROLE OF AGE AND TRAINING IN CARBONATE ASSIMILATION OF UNICELLULAR ALGAE

L. J. M. FELFÖLDY

BIOLOGICAL RESEARCH INSTITUTE OF THE HUNGARIAN ACADEMY OF SCIENCES, TIHANY  
(HEAD: E. WOYNÁROVICH)

(Received March 28, 1960)

## Summary

Photosynthetic experiments were carried out with two pure algal strains (7K. *Chlorella vulgaris* BEYER, and 953. *Coelastrum microporum* NÄG.) in KOH-K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-KHCO<sub>3</sub> solutions of different hydrogen ion and carbon concentrations by the manometric method of WARBURG. The age and pretreatment of cultures were varied. The past history of cells proved to be very important in bringing into existence the ability to assimilate bicarbonate ions. Evidence was obtained that *Coelastrum*, after a relatively short lag period, becomes able to utilize bicarbonates even if cultured in acidic nutrient solution, whereas *Chlorella* can photosynthesize only after a one month long training in a medium where the concentration of undissociated carbon dioxide is less than  $1,5 \cdot 10^{-3}$  mM/litre.

## Introduction

The work reported here deals with the problem of inorganic carbon sources of unicellular algae, and its purpose is primarily to give answer to certain hydrobiological questions. In the course of previous experiments it was observed that the rate of photosynthesis in suspensions prepared from various bacteria-free algal strains was different when the proportion of carbonic acid components was varied [3, 4]. The utilization of hydrocarbonate ions by algae is a long disputed problem in plant physiology. ÖSTERLIND [12, 13] has first shown that the planktonic green alga *Scenedesmus quadricauda* is able to utilize bicarbonate ions directly as a carbon source. According to recent investigations by STEEMANN NIELSEN and JENSEN [22] bicarbonate ions are able to penetrate into cells of *Chlorella pyrenoidosa*. The rate of penetration is, however, so low that it is of importance for photosynthesis only under special conditions.

From hydrobiological point of view it would not be indifferent to know which species of a natural population are able to take up hydrocarbonate ions? It seemed as though this question could be easily studied by RUTTNER's conductometric method, that was used first by us in the investigation of algal suspensions [3].

During the experiments, however, contradictions and confusions were observed. It has been already pointed out by ÖSTERLIND [15] that both the

age of the experimental suspension and the conditions under which it was cultured might greatly influence the utilization of hydrocarbonate ions. Experiments, performed in this direction, confirmed his statements, and gave results which deserve publication.

### Materials and methods

The two bacteria-free algal strains used in the experiments: 7K. *Chlorella vulgaris* BEYER, and 953. *Coelastrum microporum* NÄG. (isolated from Lake Balaton in our laboratory by ZSUZSA F. KALKÓ in 1954 resp. 1955) are maintained on agar slants containing glucose, peptone, yeast hydrolysate and the inorganic salts of KNOP-PRINGSHEIM nutrient solution (17 p. 35).

For preparatory cultures algae were scraped from agar slants and suspended in liquid KNOP-PRINGSHEIM medium containing 5% soil extract. The initial pH was adjusted to 7 with some drops of n-NaOH solution. The culture was aerated with 3% CO<sub>2</sub> in air which led to a decrease of pH to 6,5. Only a small fluctuation in pH (about 1—1,5 pH units) was observed during the several weeks long period of cultivation (see later).

For photosynthetic measurements aliquots were taken from cultures of different age. By means of centrifuging the algal cells were washed three times with the experimental solutions prepared as described subsequently and were resuspended in them. The concentration of algae was adjusted to about 1000 cells/ $\mu$ l by cell count in BÜRKER haemocytometer.

The algal suspensions were pipetted into WARBURG vessels and O<sub>2</sub>-uptake was measured by the usual WARBURG method (24,5). During the experiment the samples were illuminated by a 40 W luminescence tube (Tungsram F2) built into the water bath of the apparatus (light intensity c. 5000 lux) at a temperature of 25,0±0,1° C and at a shaking velocity of about 110 cycles per minute with a travel of 4,5 cm. Each set of experiments was performed in two parallels (with 10 resp. 20 ml suspensions in the parallel vessels).

The results of measurements are given in mg O<sub>2</sub>/1 mg dry matter of algae units. Determination of dry-matter was carried out by filtering the cells through filter paper "Delta" N° 368 and drying them at 105° C to constant weight.

For photosynthetic experiments solutions of different and known carbon content belonging to the 3 mM KOH-K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-KHCO<sub>3</sub> buffer system were used. They were prepared by blowing CO<sub>2</sub> gas through a 3 mM KOH solution. The solutions desired were adjusted by pH measurements. The proportion of the various carbonic acid components in the solutions was determined on the basis of the relations existing between pH and the composition of the KOH-K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-KHCO<sub>3</sub> buffer system from a diagram constructed by us [3]. The pH of the samples was measured with an electronic instrument "pH-Electrometer type 2512" (Orion-Budapest), with glass electrode and a 0,1-n calomel half cell, and was calibrated with ATKINS—PANTIN [1] buffer mixture before each series of experiments.

### Experimental results

#### Effect of age of Coelastrum cultures

It was first demonstrated by ÖSTERLIND [14] that in five day old culture of *Scenedesmus quadricauda* strain the assimilation of bicarbonate proceeds at the same rate at concentrations between 10 and 100  $\mu$ M/litre, whereas a ten day old culture of this strain loses the ability to utilize hydrocarbonate. In the course of previous experiments [4] a good bicarbonate utilization was observed in the case of four week old *Coelastrum* suspensions. Nevertheless, these studies on the effect of age did not yield consistent results.

The experiments reported here were performed in the following way. Aliquots were taken every week from the vessel containing the culture of *Coela-*

*strum microporum* for photosynthetic measurements. The four diagrams in Fig. 1 illustrate the rate of photosynthesis at the end of the first, third, fourth and sixth weeks of cultivation. The cells in the aliquots were washed by centrifuging and suspended in a 3 mM KOH solution. Through the suspensions obtained in this way CO<sub>2</sub> gas was blown quickly for different times.

Table 1  
pH and carbonic acid components in the four experimental solutions

	pH	mM/litre		
		c <sub>CO<sub>2</sub></sub>	c <sub>HCO<sub>3</sub></sub>	c <sub>CO<sub>3</sub></sub>
N° 1	10,73	2,4 · 10 <sup>-5</sup>	0,33	1,04
N° 2	9,50	0,002	2,18	0,39
N° 3	8,50	0,02	2,89	0,05
N° 4	6,80	1,4	2,99	<0,001

In Table 1 the pH and the carbonic acid components of the experimental solutions are given.

The experiments illustrated in Fig. 1 do not indicate a definite parallelism between the age of culture and the utilization of the three inorganic carbon sources. During this set of experiments an adaptation to the more alkaline medium was experienced, because whereas in the first week the oxygen production in solutions of pH values 9,5 and 10,73 remained far behind the production measured either in solution of pH 8,5 containing hydrocarbonate or that of pH 6,8 containing free carbon dioxide (Fig. 1A), in the third week the photosynthetic power in the two alkaline solutions increased considerably. Maximal photosynthetic rate of four week old cells was measured in the most alkaline medium (N° 1). In the sixth week greatest oxygen production was observed again in solution N° 3. It is noteworthy that oxygen production began immediately at the start of illumination when there was free CO<sub>2</sub> present in the solution and that the rate of assimilation did not change essentially in the course of the four experiments (A : 25 µl O<sub>2</sub>/hour, B : 28 µl O<sub>2</sub>/hour, C : 19 µl O<sub>2</sub>/hour, D : 19 µl O<sub>2</sub>/hour. There was a small decrease in older cultures). In solutions where the concentration of free carbon dioxide is below 0,02 mM there is a characteristic lag-period before the start of photosynthesis [cf. 15, 4]. In solution N° 1 in which there is a surplus of carbonate ions (see Table 1) the following changes could be registered in the rate of photosynthesis after the lag-period: A : 13 µl O<sub>2</sub>/hour, B : 36 µl O<sub>2</sub>/hour, C : 37 µl O<sub>2</sub>/hour, D : 31 µl O<sub>2</sub>/hour. It has been indicated at first by these experiments, that the rate of oxygen production in solutions of different pH values is not determined

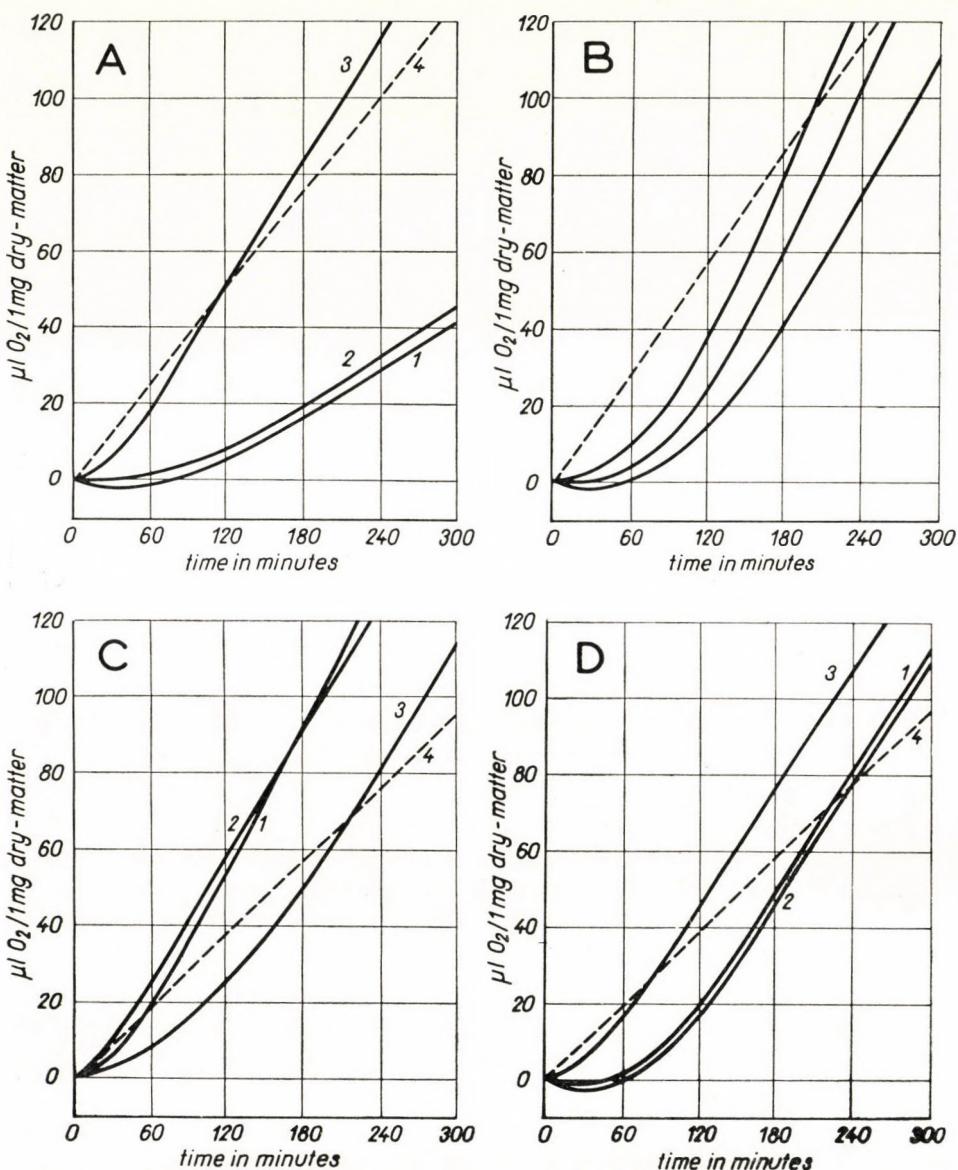


Fig. 1. Photosynthetic curves of *Coelastrum microporum* cells of different age. The cells were taken from one (A), three (B), four (C) and six week (D) old preparatory cultures. Time of experiments from 9 April to 14 May 1959. Medium of the preparatory cultures was KNOP-PRINGSHEIM nutrient solution aerated with 3% CO<sub>2</sub> in air. Changes of pH during six weeks culturing: 6,5—7,5. Properties of solutions used in photosynthetic measurements are:

1. pH = 10,73, cCO<sub>2</sub> = 2,4 · 10<sup>-5</sup> mM, cHCO<sub>3</sub> = 0,33 mM, cCO<sub>3</sub> = 1,04 mM
2. pH = 9,5, cCO<sub>2</sub> = 0,002 mM, cHCO<sub>3</sub> = 2,18 mM, cCO<sub>3</sub> = 0,39 mM
3. pH = 8,5, cCO<sub>2</sub> = 0,02 mM, cHCO<sub>3</sub> = 2,89 mM, cCO<sub>2</sub> = 0,05 mM
4. pH = 6,8, cCO<sub>2</sub> = 1,4 mM, cHCO<sub>3</sub> = 2,99 mM, cCO<sub>3</sub> < 0,001 mM

simply by the age of the preparatory culture, but rather by the different physiological conditions of the cells themselves.

#### *Effect of the past history of Coelastrum culture*

In order to examine the effect of cultural conditions on the algal material a four week old culture, which was in the phase of postexponential growth was divided into two parts. One part was transferred into fresh Knop-Pringsheim liquid medium and aerated with 3% carbon dioxide in air (pH 6,5—6,8). The second half was left in the original nutrient solution and its aeration was stopped (its pH slowly increased above 9,7). Aliquots were taken from the culture vessels weekly and photosynthetic measurements were carried out with them with the above mentioned method.

In the aerated preparatory culture, from which the algal material for the first series of experiments was taken, a slow increase in pH due to a more intensive uptake of anions was observed. Parallel with the increasing pH in the preparatory culture (Fig. 2 A, B, C) the rate of photosynthesis increased in more alkaline experimental suspensions (N° 1, 2).

In the second series of experiments performed with cells taken from the preparatory culture in which aeration was stopped for one day previous to the experiment, a high rate of photosynthesis was measured in alkaline solution (conf. Fig. 2A with Fig. 3A). Lag period, in this case, was found only in solution N° 1. Later on, due to the cessation of aeration, no lag period was to be observed, and the rate of photosynthesis in carbonate containing solutions increased gradually parallel with the increase of pH in the preparatory culture. Most intensive photosynthesis was measured in solutions N° 1 and N° 2 after a two week long cultivation without aeration (Fig. 3C).

#### *The role of training of Chlorella vulgaris cultures*

In the course of previous experiments [3, 4] it was found that the photosynthesis of 7K *Chlorella vulgaris* depended only on the presence of undissociated carbon dioxide.

Fig. 4A shows the rates of photosynthesis in *Chlorella* suspensions prepared from preparatory cultures aerated with 3% carbon dioxide in air. In this case the velocity of photosynthesis is the function of the amount of free carbon dioxide present in the solutions. It is seen from the graphs that photosynthesis decreases gradually parallel with the exhaustion of CO<sub>2</sub> in solutions N° 2 and 3, whereas in the most alkaline solution N° 1 respiration is observed instead of oxygen production. The same behaviour is characteristic of one month old cultures, if aerated with 3% CO<sub>2</sub> in air. If, however, a one month old culture of *Chlorella* is maintained without aeration for another month, while its pH

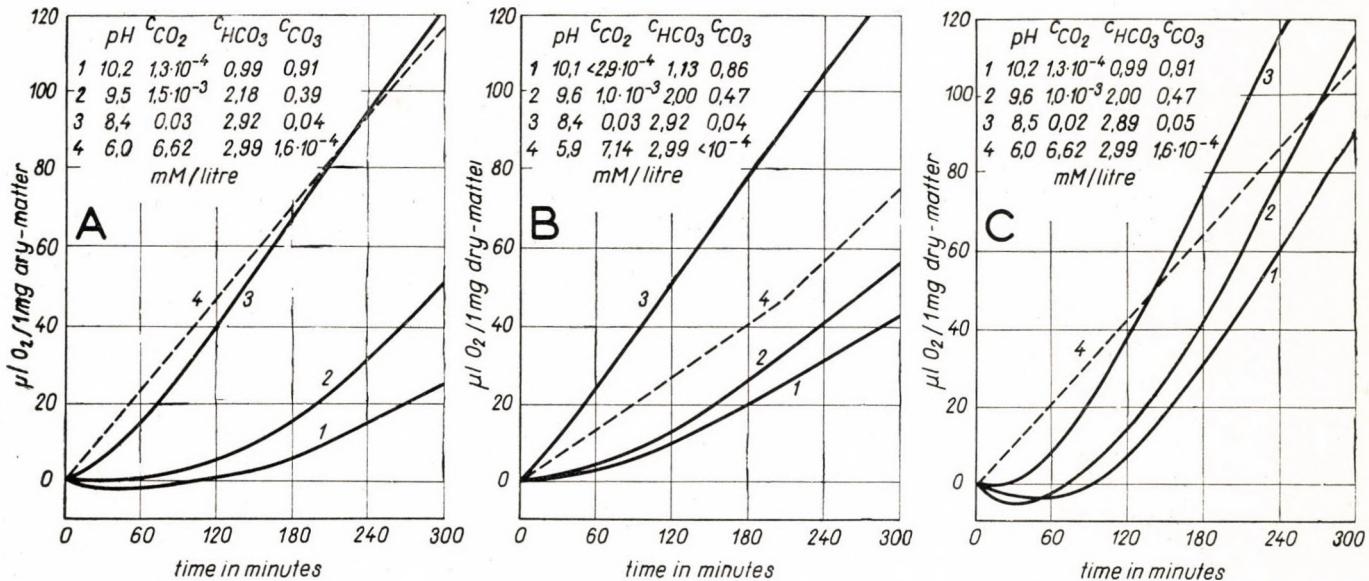


Fig. 2. Rate of photosynthesis in *Coelastrum microporum* cells originating from a preparatory culture aerated with  $CO_2$ . The four week old cells were transferred into fresh KNOP-PRINGSHEIM solution and bubbled with 3%  $CO_2$  in air ( $pH = 6.5-6.8$ ). Photosynthetic measurements on the first day after transfer into new medium (A), after one week (B) and after two weeks (C)

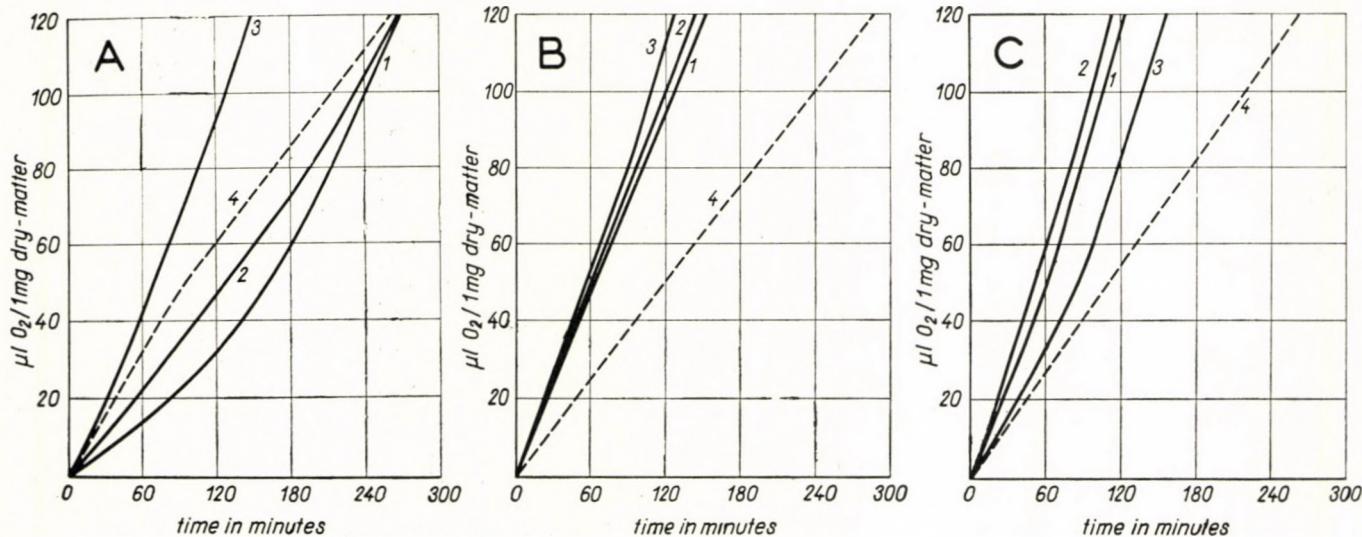


Fig. 3. Rate of photosynthesis of *Coelastrum* cells originating from cultures without aeration (rise of pH during experiment to about 9.7). A — on the next day after interruption of  $\text{CO}_2$ -addition, B — at the end of the first week, C — at the end of second week.  
The properties of experimental solutions are the same as in Fig. 2.

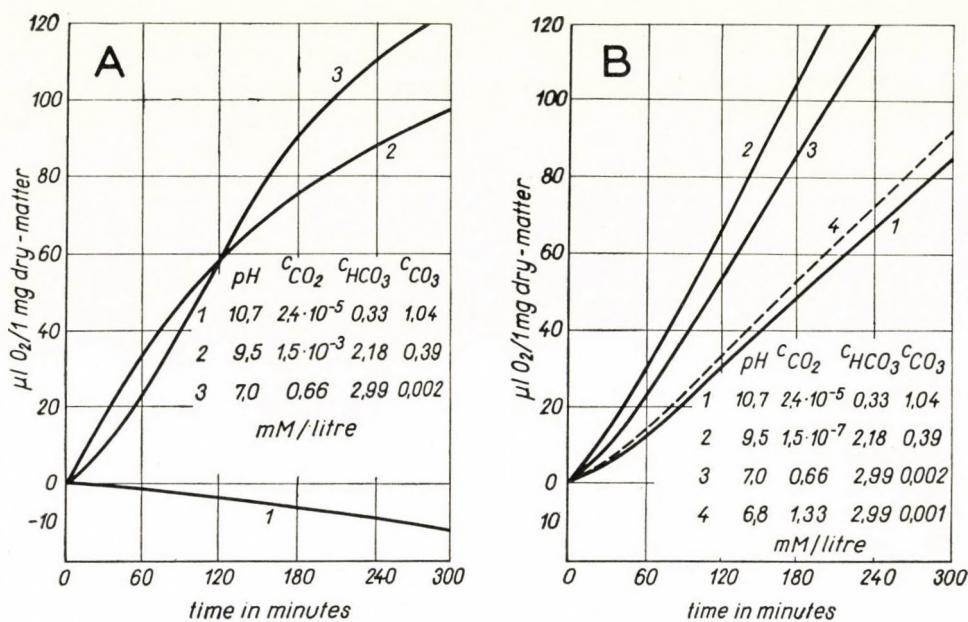


Fig. 4. The effect of past history of *Chlorella* cells. A — Three week old preparatory culture aerated with 3% CO<sub>2</sub> in air (pH = 6,9). B — Two month old culture, without aeration in the second month (pH = 8,85)

increases to 8,8, adaptation to alkaline medium takes place in this strain too (Fig. 4B).

### Conclusions

The results of experiments reported in this paper show that strains *Coelastrum microporum* and *Chlorella vulgaris* are able to utilize, under special conditions [22], hydrocarbonate ions in their photosynthetic processes. It is suggested that bicarbonate assimilation is the result of training and it is shown that, within certain limits, these organisms may be trained to assimilate at a maximal rate on substrates, that the original material was unable to utilize. The lag period occurring before assimilation of hydrocarbonate ions may be interpreted as a period that is needed by the cells to develop or activate a system for absorption of hydrocarbonate ions. In the case of *Coelastrum microporum* a relatively fast adaptation to alkaline media was registered. It is seen from the curves of Fig. 2, that even the cells taken from a one week old *Coelastrum* culture are able to produce oxygen in solution N° 1 (at pH 10,7), although the preparatory culture was aerated with 3% carbon dioxide in air and its pH was below 6,6. The 180 minute long lag period indicates that adaptation may take place in the WARBURG vessels during the photosynthetic experiment itself.

Otherwise, it was observed that if the aeration of the preparatory culture was stopped lag period did not occur (Fig. 3A).

A different behaviour could be studied in the case of *Chlorella vulgaris*. Cells taken from aerated *Chlorella* cultures, even if one month old, were not able to "get used" to the more alkaline medium, though photosynthetic experiments lasted for 300 minutes. Oxygen production decreases parallel with free carbon dioxide content (Fig. 4A). In the case of this strain adaptation to alkaline milieu was experienced only when it was cultured for one month without addition of CO<sub>2</sub> gas. According to some recent investigations the age of culture may be an important factor in the development of physiological properties of algal cells [11, 6, 19, 21]. No regular connection was observed, however, between age and carbon assimilation.

The older cells of *Scenedesmus quadricauda* in ÖSTERLIND's [14] experiments have lost their ability to assimilate bicarbonate, whereas in our experiments photosynthesis in more alkaline suspensions becomes faster parallel with age. Nevertheless, certain reversion was observed in the four and six week old cultures (Figs 1B and C). It may be assumed therefore, that changes taking place in the medium of the preparatory cultures and altering the physiological condition of the cells are more important than the effects induced by age. The importance of the past history of plants was emphasized by many authors [10, 15, 20].

It would not be perhaps too daring to speak of the hydrobiological importance of our experiments, for they help to explain, why the strain *Chlorella vulgaris*, that shows an acidophilous character under culture conditions, is able to grow in the alkaline and carbonate containing water of Lake Balaton, from which it was isolated. When considering the algal physiological methods, used to assess the primary production of natural waters [18, 23, 16, 7, 8, 9, 2], a special importance has to be attributed to the effect of training in the case of strains investigated.

Summing up the conclusions, drawn from the experiments reported here, it must be stated that there are still some questions left open: What changes may take place in the algal cells in the course of training of longer or shorter duration and of the causes inducing changes what role is played by the alteration of proportion of carbonic acid components, or by hydrogen ion concentration?

#### LITERATURE

1. ATKINS, W. R. G., PANTIN, C. F. A. (1926) A buffer mixture for the alkaline range of hydrogen ion concentration determinations. *Biochem. J.*, **20**, 102—106.
2. FELFÖLDY, L. J. M. (1959) Experiments with algal cultures for determining some properties of Balaton Lake water. *Annal. Biol. Tihany*, **26**, 211—222. (In Hungarian with English summary.)
3. FELFÖLDY, L. J. M. (1960) Experiments on the carbonate assimilation of some unicellular algae by RUTTNER'S conductometric method. *Acta Biol. Hung.*, **11**, 67—75.

4. FELFÖLDY, L. J. M. (1960) Photosynthetic experiments with unicellular algae of different photosynthetic type. *Annal. Biol. Tihany*, **27**, (in press).
5. GAFFRON, H. (1939) Methoden zur Untersuchung der Kohlensäureassimilation. (Energieumsatz bei Pflanzen.) *Abderhalden's Handb. biol. Arbeitsmeth.* XI/4/I, 101—160.
6. GEOGHEGAN, M. J. (1953) Experiments with *Chlorella* at Jealott's Hill. In BURLEW, J. S. *Algal culture from laboratory to pilot plant*, Washington, 182—189.
7. GERLOFF, G. C., SKOOG, F. (1954) Cell contents of nitrogen and phosphorus as a measure of their availability for growth of *Microcystis aeruginosa*. *Ecol.*, **35**, 348—353.
8. GERLOFF, G. C., SKOOG, F. (1957) Availability of iron and manganese in southern Wisconsin lakes for the growth of *Microcystis aeruginosa*. *Ecol.*, **38**, 551—556.
9. GERLOFF, G. C., SKOOG, F. (1957) Nitrogen as a limiting factor for the growth of *Microcystis aeruginosa* in southern Wisconsin lakes. *Ecol.*, **38**, 556—561.
10. HARDER, R. (1933) Über die Assimilation der Kohlensäure bei konstanten Außenbedingungen. *Planta*, **20**, 699—733.
11. HUTCHENS, J. O. (1941) The effect of age of the culture on the rate of oxygen consumption and the respiratory quotient of *Chilomonas paramaecium*. *J. cell. comp. Physiol.*, **17**, 321—332.
12. ÖSTERLIND, S. (1947) Growth of a planctonic green alga at various carbonic acid and hydrogen-ion concentrations. *Nature*, **159**, 199—200.
13. ÖSTERLIND, S. (1949) Growth conditions of the alga *Scenedesmus quadricauda* with special reference to the inorganic carbon sources. *Symb. Bot. Upsal.*, **10**, (3), 1—141.
14. ÖSTERLIND, S. (1951) Inorganic carbon sources of green algae. III. Measurements of photosynthesis in *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol. Plant.*, **4**, 242—254.
15. ÖSTERLIND, S. (1951) Inorganic carbon sources of green algae. IV. Photoactivation of some factor necessary for bicarbonate assimilation. *Physiol. Plant.*, **4**, 514—527.
16. POTASH, M. (1956) A biological test for determining the potential productivity of water. *Ecol.*, **37**, 631—639.
17. PRINGSHEIM, E. G. (1946) Pure cultures of algae. Their preparation and maintenance. Cambridge, Univ. Press.
18. SCHREIBER, E. (1927) Die Reinkultur von marinen Phytoplankton und deren Bedeutung für die Erforschung der Produktionsfähigkeit des Meerwassers. *Wiss. Meeresunters. Helgoland, N. F.*, **16**, (2), 1—73.
19. SOROKIN, C. (1957) Changes in photosynthetic activity in the course of cell development in *Chlorella*. *Physiol. Plant.*, **10**, 659—666.
20. SOROKIN, C. (1958) The effect of the past history of cells of *Chlorella* on their photosynthetic capacity. *Physiol. Plant.*, **11**, 275—283.
21. SOROKIN, C. and MYERS, J. (1957) The course of respiration during the life cycle of *Chlorella* cells. *J. gen. Physiol.*, **40**, 579—592.
22. STEEMANN NIELSEN, E., JENSEN, P. K. (1958) Concentration of carbon dioxide and rate of photosynthesis in *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiol. Plant.*, **11**, 170—180.
23. STRØM, K. M. (1933) Nutrition of algae. Experiments upon: the feasibility of the SCHREIBER method in fresh waters; the relative importance of iron and manganese in the nutritive medium; the nutritive substance given off by lake bottom mud. *Arch. f. Hydrobiol.*, **25**, 38—47.
24. WARBURG, O. (1919) Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäureersetzung in lebenden Zellen. *Biochem.*, **100**, 230—262.

#### DIE ROLLE DES ALTERS UND TRAININGS IN DER KOHLENSTOFFASSIMILATION DER EINZELLIGEN ALGEN

Es wurde die Photosynthese zweier reinen Algenstämme (7K. *Chlorella vulgaris* BEYER und 953. *Coelastrum microporum* NÄG.) mit der manometrischen Methode von Warburg in KOH-K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-KHCO<sub>3</sub> Lösungen untersucht. Variiert wurden Kohlenstoffgehalt und pH Wert der Lösungen. Das Alter und Vorbehandlung der Kulturen war verschieden. Die Bedingungen der Zellen vor dem eigentlichen Experiment erwiesen sich als ein sehr wichtiger Faktor im Erscheinen der Bikarbonatassimulationsfähigkeit. *Coelastrum* kann Bikarbonationen nach einer kurzen Latenzperiode assimilieren, sogar im sauren Medium. *Chlorella* erwirbt diese Fähigkeit erst nach einmonatiger Züchtung in einer Nährlösung, in der die Konzentration der undissoziierter Kohlensäure geringer ist, als 1,5x 10<sup>-3</sup> mM/l.

РОЛЬ ВОЗРАСТА И ТРЕНИРОВКИ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ  
В АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕРОДА

Исследовался фотосинтез манометрическим методом *Барбурга* у двух чистых штаммов (7К *Chlorella vulgaris* Beyer, 953. *Coelastrum microporum* Näg.) в растворах KOH—K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>—KHCO<sub>3</sub> при различных концентрациях водородных ионов и источника углерода. Исследовалось влияние различного возраста клеток и изменений предварительной обработки культур. История клеток играет большую роль в появлении способности усваивать ионы бикарбоната. *Coelastrum* сравнительно быстро, после короткого опоздания использует бикарбонат, даже в кислой среде. У *Chlorella* эта способность появится только после одного месяца тренировки в среде содержащей недиссоциированную углекислоту в концентрации меньше чем  $1,5 \cdot 10^{-3}$  тМ/л.

Lajos J. M. FELFÖLDY Tihany, Biologia, Hungary.

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója

Műszaki szerkesztő: Farkas Sándor

A kézirat nyomdába érkezett: 1960. VII. 11 — Terjedelem: 9,75 (A/5) ív, 50 ábra

---

1960.51700 — Akadémiai Nyomda, Budapest — Felelős vezető: Bernát György





The *Acta Biologica* publish papers on biological subjects in English, German, French and Russian.

The *Acta Biologica* appear in parts of varying size, making up volumes.  
Manuscripts should be addressed to :

*Acta Biologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.*

Correspondence with the editors and publishers should be sent to the same address.

The rate of subscription to the *Acta Biologica* is 110 forints a volume. Orders may be placed with "Kultura" Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

---

Les *Acta Biologica* paraissent en français, allemand, anglais et russe et publient des travaux du domaine des sciences biologiques.

Les *Acta Biologica* sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en volumes.  
On est prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction à l'adresse suivante :

*Acta Biologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.*

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise pour le Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultura» (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

---

«*Acta Biologica*» публикуют трактаты из области биологии на русском, немецком, английском и французском языках.

«*Acta Biologica*» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи следует направлять по адресу:

*Acta Biologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.*

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции и администрации.

Подписная цена «*Acta Biologica*» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «Kultura» (Budapest VI., Népköztársaság útja 21. Текущий счет 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

## INDEX

DVÍHALY, Zs. T.: Calculation of underwater distribution of radiant energy as a problem of production biology .....	77
PALKOVITS, M.—FÖLDVÁRI, I. P.: Über die antidiuretische Wirkung des Organon subcommissurale.....	91
MOLNÁR, Gy.—TÖLG, I.: Untersuchung der Dauer der Magenverdauung des Zanders ( <i>Lucioperca lucioperca</i> L.) mittels einer röntgenologischen Methode .....	103
SÄRINGER, Gy.: Untersuchungen über die Ökologie des Senfkäfers ( <i>Colaphellus sophiae</i> Schall.) .....	109
HOLLÓSI, G.—BENEDECZKY, I.—TIGYI, A.—LISSÁK, K.: The role of the nervous system in the maintenance of the ribonucleic acid and desoxyribonucleic acid content of striated muscle .....	145
VERZÁR-PETRI, G.—BARANYAI-SZENTPÉTERY, G.: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des Gynäzeums von <i>Datura stramonium</i> L. ....	155
FELFÖLDY, L. J. M.: The role of age and training in carbonate assimilation of unicellular algae .....	175

# ACTA BIOLOGICA

## ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

B. FALUDI, V. FRENYÓ, B. GYŐRFFY, J. SZENTÁGOTHAI,  
A. TIGYI, J. TIGYI

REDIGIT

I. TÖRÖ

TOMUS XI

FASCICULUS 3



1960

ACTA BIOL. HUNG.

# ACTA BIOLOGICA

## A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA BIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTŐSÉG: BUDAPEST IX., TŰZOLTÓ U. 58. KIADÓHIVATAL: BUDAPEST V., ALKOTMÁNY U. 21.

Az *Acta Biologica* angol, francia, német és orosz nyelven közöl értekezéseket a biológia köréből.

Az *Acta Biologica* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet. Évenként 1–2 kötet jelenik meg.

A közlésre szánt kéziratok a következő címre küldendők:

*Acta Biologica* szerkesztősége, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztőségi és kiadóhivatali levelezés.

Az *Acta Biologica* előfizetési ára kötetenként belföldre 80 Ft, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az *Akadémiai Kiadónál* (Budapest V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-46), a külföld számára pedig a „*Kultúra*” Könyv- és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest I., Fő utca 32. Bankszámla: 43-790-057-181) vagy annak külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

---

Die *Acta Biologica* veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereich der biologischen Wissenschaften in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die *Acta Biologica* erscheinen in Heften wechselnden Umfangs. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an folgende Adresse zu senden:

*Acta Biologica*, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

An die gleiche Anschrift ist auch jede Korrespondenz für die Redaktion und den Verlag zu senden.

Abonnementspreis pro Band: 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Außenhandels-Unternehmen »*Kultura*« (Budapest I., Fő utca 32. Bankkonto No. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

# BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER MIKROFLORA UND MIKROFAUNA IN DEN DONAUARMEN NEBEN BAJA (SÜDUNGARN)\*

ERZSÉBET KOL und L. VARGA

BOTANISCHE ABTEILUNG (VORSTAND: B. ZÓLYOMI) DES UNGARISCHEN NATURWISSENSCHAFTLICHEN  
MUSEUMS, BUDAPEST  
UND

BODENBIOLOGISCHES FORSCHUNGSLABORATORIUM (VORSTAND: G. PÁNTOS) DER UNGARISCHEN  
AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN, SOPRON

(Eingegangen am 10. Februar 1960)

## Zusammenfassung

Die »Arbeitsgemeinschaft Donauforschung der SIL«, an der alle Donauländer beteiligt sind, hatte mit grossem Schwung die Erkundung der Biozönose der Donau in Angriff genommen. In Ungarn obliegt diese Arbeit der Ungarischen Donauforschungsstation. In der vorliegenden Abhandlung wird die Bearbeitung jenes Planktonmaterials dargeboten, das KOL in den Monaten Mai und Juli 1951 aus der Donau und ihren fünf Nebenarmen in der Umgebung von Baja eingesammelt hat. Die über das Phyto- und Zooplankton veröffentlichten Angaben spiegeln also den vor fast 10 Jahren gewesenen Zustand wider. Zur Zeit der Sammelerarbeit hatte die Donau einen hohen Wasserstand. Die Algenassoziationen waren in jedem Donauarm unterschiedlich. Es zeigten sich Unterschiede auch in der Zusammensetzung der Mikrofauna, von welcher eingehend die Rotatorien bearbeitet wurden. Hierbei zeigte sich, dass die Bajaer Donauarme, obwohl ihre Gewässer hydrographisch mehr oder minder miteinander verbunden sind, selbständige Biotopen darstellen, die alle eine eigene Lebensgemeinschaft aufweisen. Ungeachtet dessen kommen in ihnen zahlreich auch gemeinsame Arten vor.

Im Phytoplankton der untersuchten Donauarme dominierten — mit einem Anteil von 51 bis 80% — die Chlorophyta-Arten. Die zum Vorschein gekommenen pflanzlichen Mikroorganismen gehörten insgesamt 97 Arten an. Unter diesen fanden sich 32 Arten, die aus dem ungarländischem Abschnitt der Donau bisher nicht bekannt waren. In den untersuchten Biotopen wurden auch zahlreiche seltene Algenarten festgestellt.

Das Zooplankton bestand im Frühjahr, besonders aber im Sommer, zum überwiegenden Teil aus Rotatorien. Die Crustaceen erreichten bloss in einem Falle 30%, waren jedoch im Sommer nur mit 2 bis 5% vertreten. Neben den euplanktischen Arten kamen auch viele tychoplanktische vor, die sich in Süßwasserbiotopen nur passiv zu Planktons scharen. Es konnte das Vorhandensein von insgesamt 98 Arten, 17 Varietäten und 2 Formen ermittelt werden. Doch spielen von diesen in der planktischen Biozönose der Bajaer Donauarme etwa 10 Rotatoria-Arten (8,5%) mit ihrem massenhaften Auftreten die Hauptrolle. Im Plankton der Donauarme gibt es viele stark variierende Arten; diese Tatsache ist wahrscheinlich mit den eigenartigen, sehr mannigfältigen und ständig wechselnden ökologischen Verhältnissen des Flusswassers zu erklären. Die Varietäten gehören vorwiegend den euplanktischen Arten an. Eine derart grosse Zahl kommt z. B. im Plattensee (Balaton) nie vor. Im Phyto- und Zooplankton der Donauarme leben auch im Sommer Arten, die in andern stehenden Gewässern Ungarns (z. B. im Plattensee) nur im Winter anzutreffen, dort also kaltstenertherme Formen sind. Für die ungarländische Fauna konnten 13 Arten (Varietäten, Formen) als neu nachgewiesen werden.

## Einleitung

Über die pflanzlichen Mikroorganismen der ungarischen Donaustrecke finden wir schon in den letzten Dezennien des vergangenen Jahrhunderts Literaturangaben vor. BORBÁS [2] erwähnt im Jahre 1879 die Rotalge *Chamtransia chalybea* der Donaumühlen. FILARSZKY [8] beschreibt 1893 mehrere

\*Danubialia Hungarica IX.

*Chara*-Arten aus dem Kelenfölder Donauarm. ISTVÁNFFI [12] berichtet i. J. 1893 über Kieselalgen, die er im Herbarium KITAIBELS sowie in den Komitaten Tolna und Fehér entdeckte.

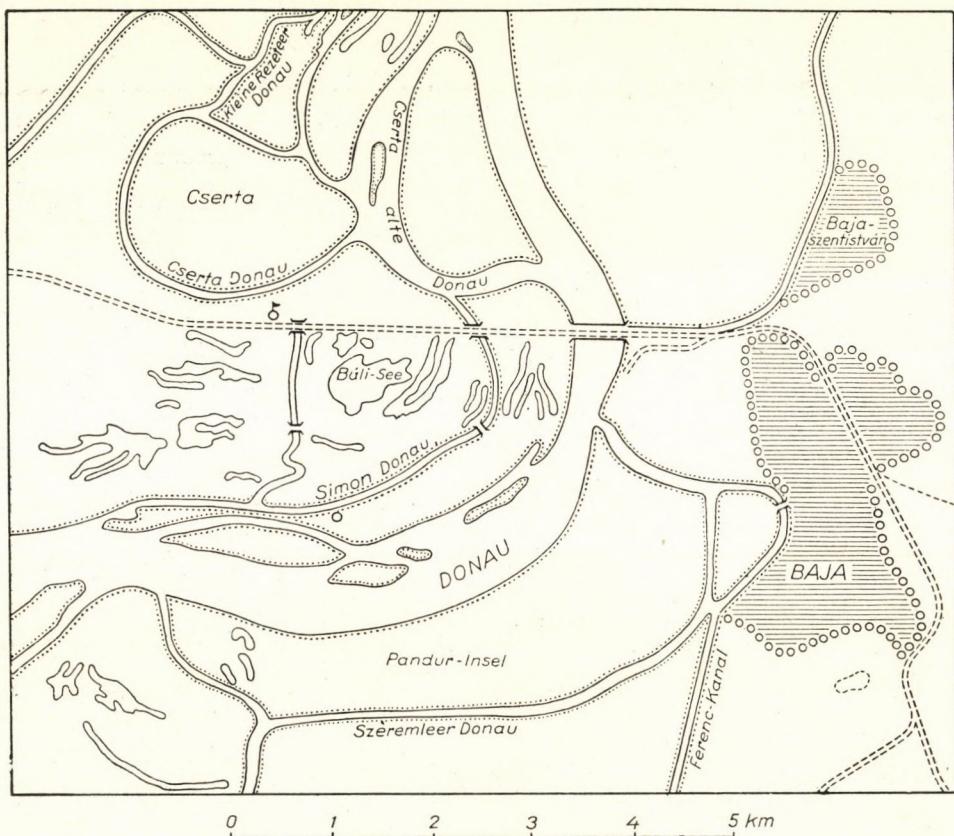


Abb. 1. Kartenskizze der untersuchten Biotope

Später — in den Jahren 1917 und 1931 — gibt KREPUSKA [13, 14] Nachricht über Euglenophyta-, Chlorophyta-Arten und andere Mikroorganismen, die er im Winterhafen Ujpest sammelte. CHOLNOKY [3] bearbeitete 1922 Benthos- und Plankton-Kieselalgen aus der Umgebung von Káposztás-megyer, Soroksár und Ráckeve. ENTZ [6] beschreibt im Jahre 1931 Flagellata- und Dinoflagellata-Arten aus dem Ujpester Winterhafen. HALÁSZ [10] zählt i. J. 1936 insgesamt 82, verschiedenen Gruppen der Systematik angehörende Algenarten aus dem Soroksárer Donauarm auf und erwähnt 1937 [11] aus derselben Stromstrecke 141 Kieselalgenarten. TAMÁS [18] legt 1949 Rechenschaft über 150 Algenarten des Budapest Abschnittes der Donau ab. PALIK [15a] i. J. 1949 untersucht die Zellteilung des in dem Soroksárer Donauarm lebende *Hydrodictyon utriculatum*. MUHITS [16] stellte

1952 in der Umgebung von Vác und 1955 [17] auf der Donaustrecke Rajka—Baja Untersuchungen über die Verunreinigung des Wassers an. LESENYEI, PAPP und TÖRÖK [15] führten im Jahre 1954 auf der Budapestner Donaustrecke physikalische, chemische, biologische bzw. bakteriologische Untersuchungen durch und erwähnten zahlreiche Algenarten. ÉBER [5] verglich 1955 das Plankton der Donau mit jenem anderer Flüsse. UHERKOVICH [19]

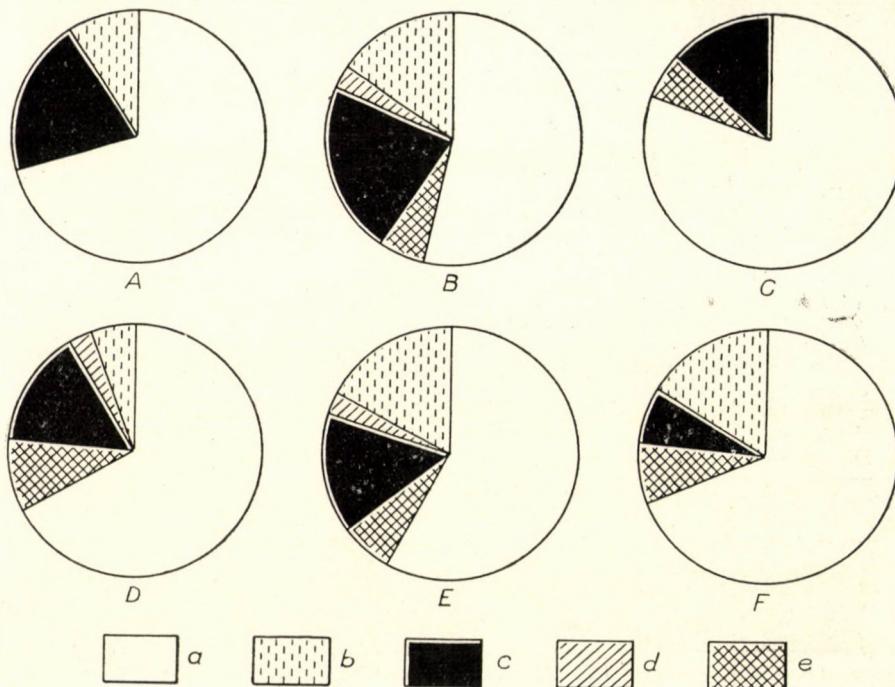


Abb. 2. (A—F) Algendiagramme. Anteil der Algenarten in den einzelnen Donauarmen (a = Chlorophyta; b = Cyanophyta; c = Chrysophyta; d = Pyrrophyta; e = Euglenophyta). — A. Hauptarm. — B. Cserta-Donau. — C. Cserta-Alte-Donau. — D. Simon-Donau. — E. Szentremleer-Donau. — F. Ferenc-Kanal

fand 1956 bei Baja in den Donauarmen »Kamarás« und »Rezét« 100, im Donaukanal Szentendre 7 Algenarten vor und berichtet im Jahre 1957 [20] über die auf den Donaumühlen in der Gesellschaft von 6 Kieselalgenarten entdeckte Rotalge *Bangia atropurpurea*. Über die Mikrofauna der von den Verfassern untersuchten Donaustrecke veröffentlichte bis jetzt bloss WOYNÁROVICH [21] Angaben im Jahre 1944.

#### Material and Methodik

KOL führte hydrobiologische Untersuchungen durch und sammelte im Jahre 1951 vom 28. bis 31. Mai sowie vom 23. bis 25. Juli in den um Baja befindlichen Donauarmen, bei ziemlich hohem Wasserstand verschiedene Mikroorganismen. Das Einbringen des Planktons erfolgte

1\*

mit dem Planktonnetz Nr. 25. Zum Fixieren des gesammelten Materials diente 4%iges Formalin. Der hier dargebotene Aufsatz enthält die Ergebnisse der Untersuchungen, die an der auf diese Weise sichergestellten Mikroflora und Mikrofauna vorgenommen wurden.

Das Areal der Sammeltätigkeit ist auf der beiliegenden Kartenskizze (Abb. 1) dargestellt. Das Untersuchungsmaterial stammt aus der Umgebung der Stadt Baja, teils aus dem Hauptarm der Donau (»Élő Dunak«; Abb. 3, 9, 11), teils aus ihren Armen, die folgende Bezeichnungen führen: »Cserta-Alte-Donau« (»Cserta Öreg Dunak«; Abb. 5, 7, 8), »Cserta-Donau« (»Cserta Dunak«; Abb. 12), »Simon-Donau« (»Simon Duna«; Abb. 6) in der Nähe von Pörböl, »Szeremleer-Donau« (»Szeremlei Dunak«, auch »Sugovicák« genannt; Abb. 10). Einiges Material lieferte ferner auch die neben der Pandur Insel liegende Strecke des Ferenc-Kanals (Abb. 4).

Im algologischen Teil des Aufsatzes wurden aus dem Material, das im Jahre 1951 der Algothek der Botanischen Abteilung des Naturwissenschaftlichen Museums des Ungarischen Nationalmuseums zugegangen ist, folgende Proben bearbeitet: 360 bis 374 (29. V. 1951), 378 bis 380 (30. V.), 385 bis 390 (31. V.), 400 bis 410 (31. V.) und 413 bis 419 (25. VII.).

Bei der zoologischen Auswertung des für algologische Zwecke gesammelten Materials sollten in erster Reihe die Arten der Rotatorien bestimmt werden.

Die Sammelarbeit erstreckte sich außerdem — für ausgesprochen zoologische Untersuchungen — auch auf andere Subbiotypen. So gelangte auch jenes Material zur Überprüfung, das nicht mit Hilfe von Netzen, sondern in irgendeiner anderen Weise gewonnen wurde. Am Ufer der Cserta-Alten-Donau haben wir von den Planken eines Kahnes etwas Material abgekratzt (24. VII.), aus der Simon-Donau einen schwimmenden Klumpen von Fadenalgen fixiert (30. V.) und von dortselbst am 24. Juli der am Wasser schwimmenden gallertartigen Algenmasse Proben entnommen. Aus schwimmenden Klumpen von Fadenalgen lieferten Cserta-Donau (24. VII.) und Szeremleer-Donau (24. VII.) Proben zum Fixieren, im letztgenannten Donauarm wurde auch vom Ufer grusiges Material eingebracht (25. VII.). Beim Ausritt des Ferenc-Kanals haben wir von der Schleuse sowie von der Molowand Schabsel und neben der Schleuse Pflanzenreste gesammelt. In diesem Material waren nicht nur Algen, sondern auch Mitglieder der Wassermikrofauna — hauptsächlich stark zusammengeschrumpfte und deshalb unbestimmbare Bdelloideen, Notommatiden (Rotatorien) — vorhanden.

Die vorliegende Arbeit behandelt also vor fast 10 Jahren, bei hohem Wasserstand gewesene Umstände, die Landschaftsaufnahmen veranschaulichen ebenfalls die damaligen Verhältnisse.

### Kurze Charakterisierung der untersuchten Biotope

In der Umgebung von Baja stellen der Hauptarm und die verschiedenen Nebenarme der Donau sehr mannigfaltige, interessante und wertvolle Biotope dar. Die in ihnen herrschenden Faktoren bieten für sehr abwechslungsreiche Assoziationen der Algen und anderer Mikroorganismen in den verschiedenen Perioden des Jahres günstige Lebensbedingungen. In dieser Arbeit soll ein zu Ende des Frühjahrs und im Sommer, bei hohem Wasserstand ein-tretender Zustand aufgezeigt werden.

Im Jahre 1951 waren während des Einsammelns beim Hauptarm folgende Werte des Wasserstandes zu verzeichnen:

Mai	Juli
am 23. 563 cm	am 28. 506 cm
am 24. 560 cm	am 29. 512 cm
am 25. 542 cm	am 30. 526 cm
	am 31. 544 cm

In diesem Frühjahr kulminierte der Wasserstand des Hauptarmes am 17. Mai mit 708 cm. Auch zwischen den zwei Perioden des Einsammelns trat eine Hochflut auf, wobei der Wasserstand 646 cm erreichte. Im Jahre 1951 betrug der Jahresschnitt des Wasserstandes der Donau bei Baja 364 cm, und sank auf den niedrigsten Wert von 140 cm am 3. November.\*

Die Cserta-Alte-Donau (Abb. 5, 7, 8) ist eigentlich eine mehrere Kilometer lange grosse Schleife des alten Donaubettes, die bei der Regulierung mittels eines Durchstiches aus dem

\* Die Angaben über den Wasserstand des Hauptarmes verdanken wir dem Ungarischen Forschungsinstitut für Wasserwirtschaft, Budapest.

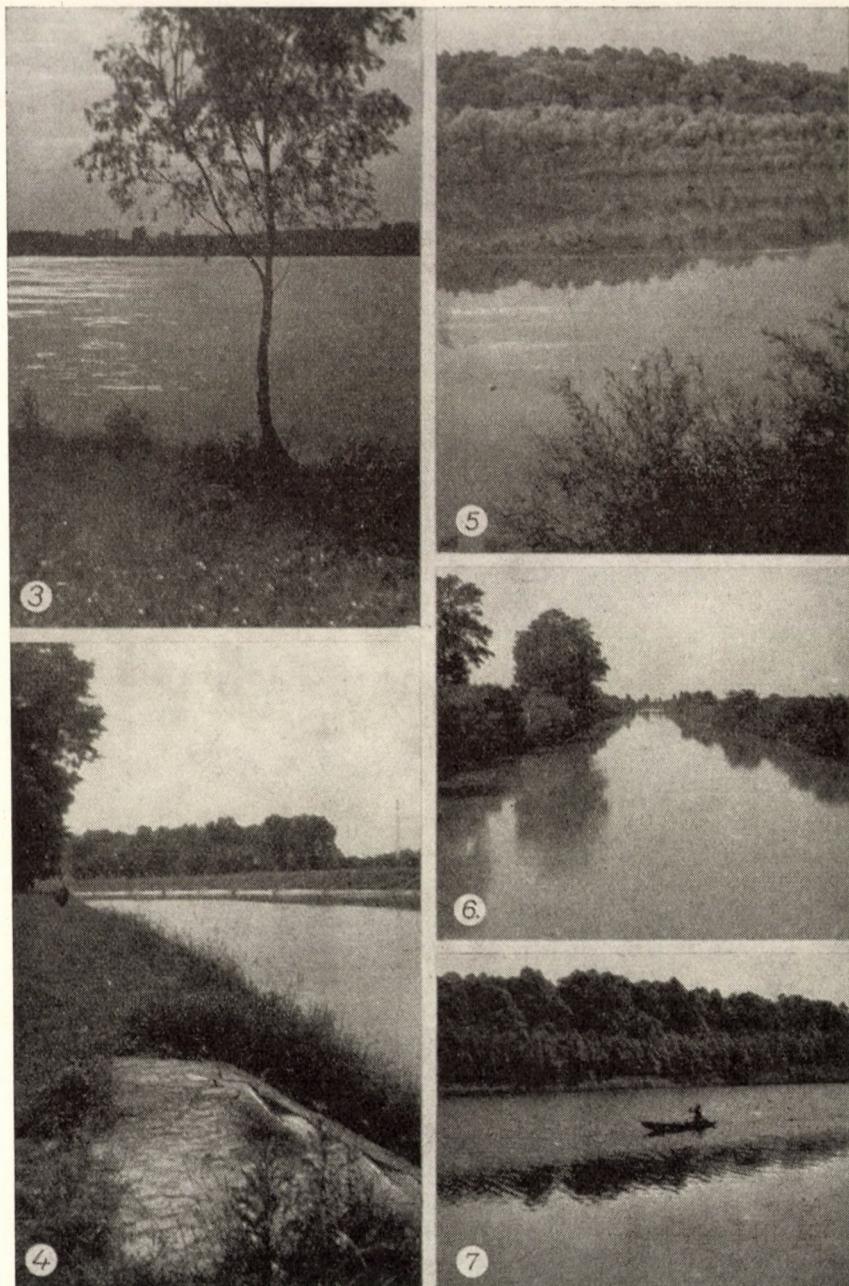


Abb. 3. Der Hauptarm bei Baja im Mai, bei hohem Wasserstand. Abb. 4. Der Ferenc-Kanal im Juli. Abb. 5. Die Cserta-Alte-Donau, ein Abschnitt am linken Ufer im Juli. Abb. 6. Die Simon-Donau im Juli. Abb. 7. Die Cserta-Alte-Donau oberhalb der Cserta-Donau im Mai

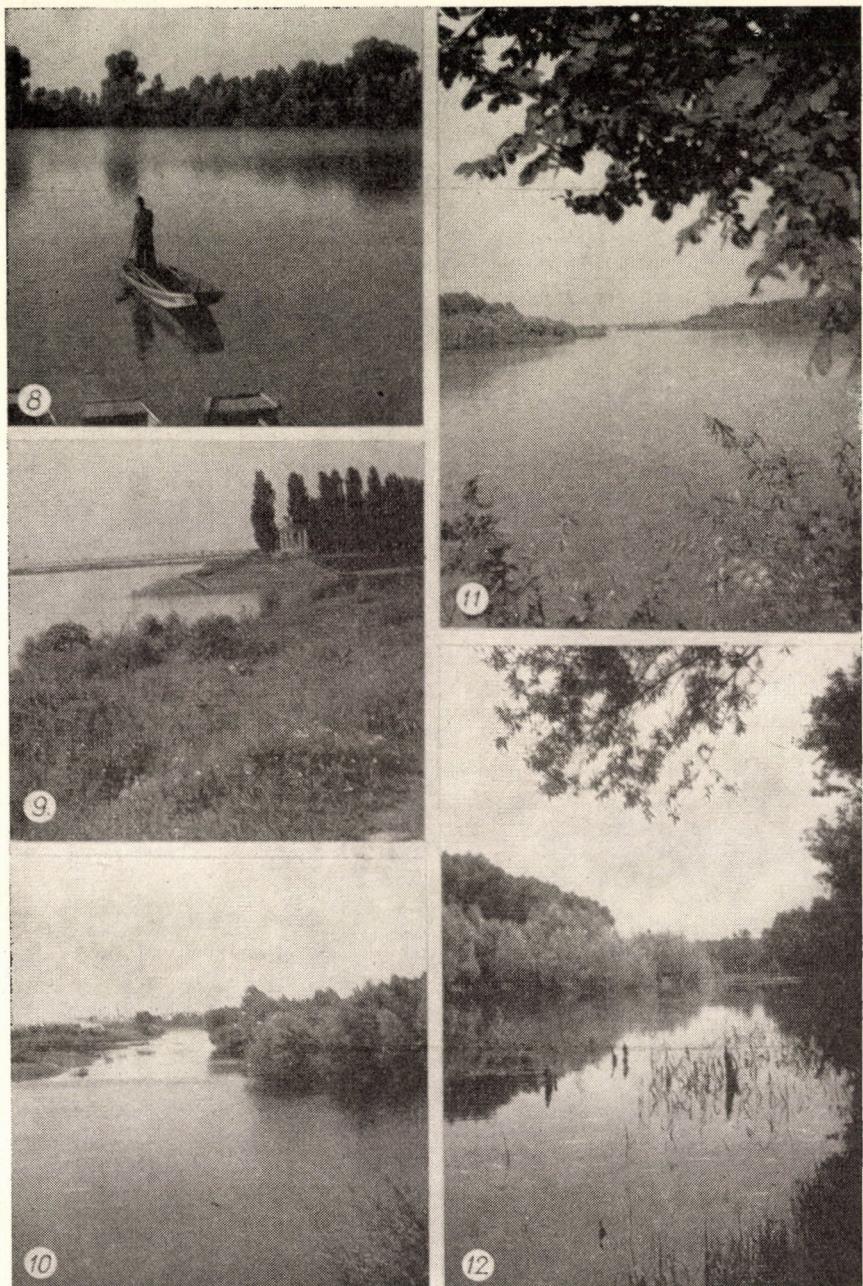


Abb. 8. Die Cserta-Alte-Donau, ein Abschnitt am rechten Ufer. Abb. 9. Der Hauptarm bei Baja, mit der Mündung des Szeremleer-Donauarmes im Mai. Abb. 10. Die Szeremleer-Donau in der Nähe von Baja, im Mai. Abb. 11. Der Hauptarm unterhalb Baja, bei der Pandur Insel im Mai. Abb. 12. Die Cserta-Donau im Mai

Verkehr ausgeschaltet wurde. Ihr Wasser ist jedoch mit dem Hauptarm in ständiger Verbindung, die höchstens bei sehr niedrigem Wasserstand unterbrochen wird. Sowohl längs des Hauptarmes als auch an beiden Ufern der Cserta-Alten-Donau stehen Galeriewälder.

Das Wasser der in der Richtung der Pandur Insel befindlichen Donauarme — der Szerelemeer-Donau (Abb. 10) und des Ferenc-Kanals (Abb. 4) — ist genügend tief und beleuchtet, ihre Ufer sind reguliert.

Von den untersuchten Donauarmen wies Cserta-Donau die mannigfältigste Vegetation an Pflanzen höherer Ordnung auf. Während des im Mai vorgenommenen Einsammelns enthielt dieser Arm folgende Arten in grösseren Mengen: *Nuphar luteum*, *Ceratophyllum demersum*, *Trapa natans*, *Potamogeton crispus*, *Iris pseudacorus*, *Sium latifolium*, *Rumex hydrolapathum*, *Caltha palustris*.\* Seine Ufer tragen Waldbestände und Sträucher, sein Bett ist vielerorts beschattet.

Der pH-Wert der untersuchten Donauarme schwankte zwischen 7,7 und 8,5. Die Wassertemperatur war beim Hauptarm am niedrigsten: 18° C, die der übrigen Donauarme betrug 19 bis 24° C (Tabelle 1). Das Wasser der Cserta-Alten-Donau ist in engster Verbindung mit dem des Hauptarmes, deshalb hatte es eine Temperatur von bloss 19° C. Auch der pH-Wert dieses Wassers steht näher zu dem des Hauptarmes als zu jenen der übrigen Arme. Der pH-Wert des Wassers im Hauptarm schwankte von 7,7 bis 8,0, in der Cserta-Alten-Donau stieg er — durch die verschiedenen Eigenschaften der Messstellen bedingt — auf 7,9 bis 8,2. Die Temperatur des Wassers der übrigen Arme und des Ferenc-Kanals war um einige Grade höher und sein pH-Wert erreichte — oder überstieg sogar — die Zahl 8.

Tabelle 1

Temperatur und pH-Wert des Wassers der Donauarme zur Zeit des Einsammelns

	Temperatur (°C)		pH-Wert	
	Mai	Juli	Mai	Juli
Hauptarm .....	18	18	8	7,7 *
Cserta-Alte-Donau .....	19	21—22	8,2	7,9
Cserta-Donau .....	21	22	8,4	8
Simon-Donau .....	21	22	8,3	8
Szeremeleer-Donau .....	21	22	8,5	8
Ferenc-Kanal .....	21	24	—	8

### Das Phytoplankton

Die Algengesellschaften, die im Phytoplankton der um Baja verlaufenden Donauarme vorkommen, sind — der unterschiedlichen Eigenart der einzelnen Biotope gemäss — sehr mannigfaltig (Abb. 13 bis 16). Im Phytoplankton des Hauptarmes (Abb. 13) dominieren die *Asterionella*-Arten, doch sind in diesem auch andere Kieselalgen zahlreich vertreten. Die Cserta-Alte-Donau (Abb. 16) beherbergt ebenfalls viele Asterionellen und andere Kieselalgenarten. Beide Gewässer stehen in ständiger Verbindung miteinander, es ist also als natürliche Folge zu betrachten, dass ihr Plankton ähnliche Züge aufweist. Man findet aber trotzdem Unterschiede in der Zusammensetzung der Algengesellschaften bei den erwähnten zwei Planktontypen der Kieselalgen. Im Plankton

\* Nach den Angaben von Dr. VERA CSAPODY.

Tabelle 2

## Die Mikroflora der Donauarme bei Baja

	Mikroorganismen	Zeit des Einstammelns — 1951.	Hauptarm °C 18 pH 7,7—8,4	Cserta-Donau °C 21 pH 7,9—8,4	Cserta-Alte-Donau °C 19 pH 8	Simon-Donau °C 22 pH 8	Szemerleer-Donau °C 21 pH 8—8,5	Ferenc-Kanal °C 24 pH 8
<b>Algae</b>								
<i>Chlorophyta</i>								
Volvocales								
1.	<i>Eudorina elegans</i> EHRENB. ....	V. VII.	2—3	2	2	1—2	3—4	
*2.	<i>Eudorina illinoensis</i> PASCHER ....	V. VII.	1				2—3	1—2
3.	<i>Gonium pectorale</i> MÜLLER ....	VII.				2	2	
4.	<i>Pandorina morum</i> (MÜLLER) BORY ..	V. VII.	3	2—3	2	2	3	2
Chlorococcales								
5.	<i>Actinastrum hantzschii</i> LAGERH. ....	V. VII.	2—3	2	3	2	3	2
	<i>Actinastrum hantzschii</i> var. <i>fluviatilis</i> SCHRÖDER ....	VII.		2—3			3—4	1—2
*6.	<i>Ankistrodesmus convolutus</i> CORDA ...	V. VII.	2					
7.	<i>Ankistrodesmus falcatus</i> (CORDA) RALFS	V. VII.	2	2	2	2	2	2
	<i>Ankistrodesmus falcatus</i> var. <i>mirabile</i> W. ET G. S. WEST. ....	V. VII.	2—4			3	2	2—3
8.	<i>Ankistrodesmus setigerus</i> (SCHRÖDER) G. S. WEST. ....	V. VII.	3					1—2
9.	<i>Coelastrum microporum</i> NÄG. ....	V. VII.		2		2	3	3
10.	<i>Coelastrum proboscideum</i> BOHL. ....	VII.					1—2	
11.	<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i> NÄG. ....	V. VII.						2
*12.	<i>Dictyosphaerium pulchellum</i> WOOD ..	V. VII.	2	2	1—2	2		
*13.	<i>Gloeocystis ampla</i> KG. ....	V.				2		
*14.	<i>Gloeocystis planctonica</i> (W. ET G. S. WEST) LEMM. ....	V.				2		
15.	<i>Kirchneriella obesa</i> (W. WEST) SCHMIDLE	VII.				2		
*16.	<i>Oocystis gigas</i> var. <i>borgei</i> LEMM. ....	VII.				1—2		
17.	<i>Pediastrum boryanum</i> (TURP.) MENEGH.	V. VII.		2	1—2	2	2	
	<i>Pediastrum boryanum</i> var. <i>granulatum</i> (KG.) AL. BRAUN ....	V.						1
18.	<i>Pediastrum duplex</i> MEYEN ....	VII.				1—2	2	1—2
	<i>Pediastrum duplex</i> var. <i>genuinum</i> AL. BRAUN ....	V. VII.	2	1—2	1—2	2	1—2	
	<i>Pediastrum duplex</i> var. <i>reticulatum</i> LAGERH. ....	V. VII.	2—3	1—2		2—3	2	
	<i>Pediastrum duplex</i> var. <i>subgranulatum</i> RACIB. ....	V.				1—2		
19.	<i>Pediastrum tetras</i> (EHRENB.) RALFS .	VII.			1—2	2	2—3	
20.	<i>Richteriella botrytis</i> (SCHMIDLE) LEMM. .	VII.			2	2		
21.	<i>Scenedesmus acuminatus</i> (LAGERH.) CHODAT ....	V. VII.	1—2	2—3		1—2	2	
22.	<i>Scenedesmus arcuatus</i> LEMM. ....	VII.			1—2		1—2	
23.	<i>Scenedesmus acutus</i> MEYEN ....	V.			1—2		2	
24.	<i>Scenedesmus bijugatus</i> β <i>alternans</i> HANSG. ....	VII.					1—2	
25.	<i>Scenedesmus denticulatus</i> LAGERH. ....	VII.		1—2			1—2	2
26.	<i>Scenedesmus falcatus</i> CHODAT ....	VII.		1—2		2		1—2

	Mikroorganismen	Zeit des Einsammelns — 1951.	Hauptarm °C 18 pH 7,7—8,4	Gselta-Donau °C 21 pH 7,9—8,4	Gselta-Alte-Donau °C 19 pH 8	Szrenemler-Donau °C 22 pH 8	Szrenemler-Donau °C 21 pH 8—8,5	Ferenc-Kanal °C 24 pH 8
27.	<i>Scenedesmus obliquus</i> (TURP.) KG. ....	V.	2	1—2	2	2	1—2	2
28.	<i>Scenedesmus opoliensis</i> P. RICHT. ....	VII.						2
29.	<i>Scenedesmus quadricauda</i> (TURP.) BRÉB. <i>Scenedesmus quadricauda</i> var. <i>dispar</i> BRÉB. ....	V. VII.	2	2	2	2	2	2
30.	<i>Scenedesmus quadrispina</i> CHODAT ...	V. VII.	1—2			1—2		1—2
*31.	<i>Scenedesmus semperfivens</i> CHODAT ...	VII.						1—2
32.	<i>Selenastrum gracile</i> REINSCH ....	VII.						1—2
33.	<i>Selenastrum minutum</i> (NAEG.) COLL. ....	V. VII.	2		2	2		1—2
*34.	<i>Tetraedron schmidlei</i> (SCHROEDER) LEMM. ....	VII.						1—2
	Ulotrichales							
*35.	<i>Coleochaete orbicularis</i> PRINGSHEIM ..	V.	1—2					
*36.	<i>Microspora pachydermum</i> (WILLE) LAGERH. ....	V.			2			
*37.	<i>Sphaeroplea annulina</i> (ROTH) AG. ....	VII.		3—4				
	Cladophorales							
38.	<i>Cladophora glomerata</i> (L.) KG. ....	V. VII.				2—3	4—5	
	Chaetophorales							
39.	<i>Stigeoclonium tenue</i> KG. ....	VII.					2	
	Oedogoniales							
*40.	<i>Oedogonium fragile</i> WITTR. SEC. HIRN.	V.			2—3			
41.	<i>Oedogonium</i> sp. ....	V.	2	2	2—3	2		
	Conjugales							
*42.	<i>Closterium dianae</i> EHRENB. ....	V. VII.		1—2	1—2			
	<i>Closterium dianae</i> var. <i>pseudodianae</i> KRIEGER ....	V.	1—2					
43.	<i>Closterium leibleini</i> KG. ....	V.			2			
44.	<i>Closterium moniliforme</i> (BORY) EHRENB.	VII.				2		
*45.	<i>Cosmarium etchachanense</i> BOY ET BISS.	VII.						1—2
46.	<i>Cosmarium laeve</i> RABENH. ....	V. VII.			2	2		2
47.	<i>Cosmarium punctulatum</i> BRÉB. ....	V.		1—2	1—2			
48.	<i>Cosmarium rectangulare</i> var. <i>hexagonum</i> (ELFV.) WEST. ....	V.	1—2					
*49.	<i>Cosmarium sexnotatum</i> GUTW. ....	VII.			2			
*50.	<i>Cosmarium subcostatum</i> NORDST. ....	VII.				1—2		
*51.	<i>Cosmarium vexatum</i> WEST ....	VII.				1—2		
*52.	<i>Cylindrocystis brébissonii</i> MENEGH. ....	VII.						1—2
53.	<i>Staurastrum polymorphum</i> BRÉB. ....	VII.	1—2	1—2				
54.	<i>Mougeotia</i> sp. ....	V. VII.	1—2			2	2	
*55.	<i>Spirogyra decimina</i> (MÜLL.) KG. ....	VII.					2	
*56.	<i>Spirogyra longata</i> (VAUCH.) KG. ....	VII.				2—3		
57.	<i>Spirogyra</i> sp. ....	V. VII.			2			2
*58.	<i>Zygnema insigne</i> (HASSAL) KG. ....	V.			2			

	Mikroorganismen	Zeit des Einsammelns — 1951.	Hauptarm °C 18 pH 7,7—8,4	Cserta-Donau °C 21 pH 7,9—8,4	Cserta-Alte-Donau °C 19 pH 8	Simon-Donau °C 22 pH 8	Szeremleer-Donau °C 21 pH 8—8,5	Ferenc-Kanal °C 24 pH 8
	<b>Euglenophyta</b>							
59.	<i>Euglena acus</i> EHRENB. ....	VII.				1—2	1—2	
*60.	<i>Euglena fusca</i> (KLEBS.) LEMM. ....	VII.		1—2				
61.	<i>Euglena proxima</i> DANG. ....	VII.	2	2	2	2	2	1—2
62.	<i>Euglena tripterus</i> (DUJ.) KLEBS. ....	VII.				1—2	1—2	
63.	<i>Phacus longicauda</i> (EHRENB.) DUJ. ....	VII.				1—2		
64.	<i>Phacus pleuronectes</i> (O. F. M.) DUJ. ....	V. VII.	2	2	2	2—3	1—2	
	<b>Chrysophyta</b>							
	<b>Xanthophyceae</b>							
*65.	<i>Planktonema lauterbornii</i> SCHMIDLE ..	VII.	1—2	2		2	3—4	
	<b>Chrysophyceae</b>							
66.	<i>Dinobryon divergens</i> LEMM. ....	VII.			1—2	1—2		
67.	<i>Dinobryon sertularia</i> EHRENB. ....	V. VII.	2	2	2	3—4		2—3
68.	<i>Dinobryon sociale</i> EHRENB. ....	VII.			1—2	1—2		
69.	<i>Dinobryon stipitatum</i> STEIN ....	VII.				1—2		
70.	<i>Synura uvella</i> EBRENB. ....	VII.		1—2	3—4			
*71.	<i>Trachelomonas armata</i> (EHRENB.) STEIN .....	V.		1—2				
72.	<i>Trachelomonas hispida</i> var. <i>coronata</i> LEMM. ....	VII.					1—2	
73.	<i>Trachelomonas volvocina</i> EHRENB. ....	V.		1—2				
	<b>Bacillariophyceae</b>							
74.	<i>Asterionella formosa</i> HASSAL ....	V.	2—3				5	
75.	<i>Asterionella gracillima</i> (HANTZSCH) HEIBERG .....	V. VIII.	4—5	3	4	2	3—4	4—5
76.	<i>Melosira</i> sp. ....	V. VII.	2—3	3—4		3	3	2
77.	<i>Synedra</i> sp. ....	V. VII.	2	2—3				
	<b>Pyrrophyta</b>							
78.	<i>Ceratium hirundinella</i> O. FR. M. ....	VII.		2—3		2	2	
	<b>Cyanophyta</b>							
	<b>Chroococcaceae</b>							
79.	<i>Chroococcus minutus</i> (KG.) NÁG. ....	VII.						1—2
80.	<i>Gomphosphaeria aponica</i> KG. ....	VII.					2	
*81.	<i>Gomphosphaeria lacustris</i> CHODAT ...	VII.		2		2	2	
82.	<i>Merismopedia punctata</i> MEYEN ....	VII.		2			2	2—3
83.	<i>Microcystis aeruginosa</i> KG. ....	VII.					2	
84.	<i>Microcystis flos-aquae</i> (WITTR.) KIRCHN.	VII.					2	2
	<b>Nostocaceae</b>							
*85.	<i>Anabaena plantonica</i> BRUNNTH. ....	V.					2	
*86.	<i>Anabaena sphaerica</i> var. <i>tenuis</i> G. S. WEST .....	VII.				4—5	1—2	
87.	<i>Aphanisomenon flos-aquae</i> (L.) RALFS .	VII.	1—2	1—2				
*88.	<i>Aphanisomenon gracile</i> LEMM. ....	VII.		2				

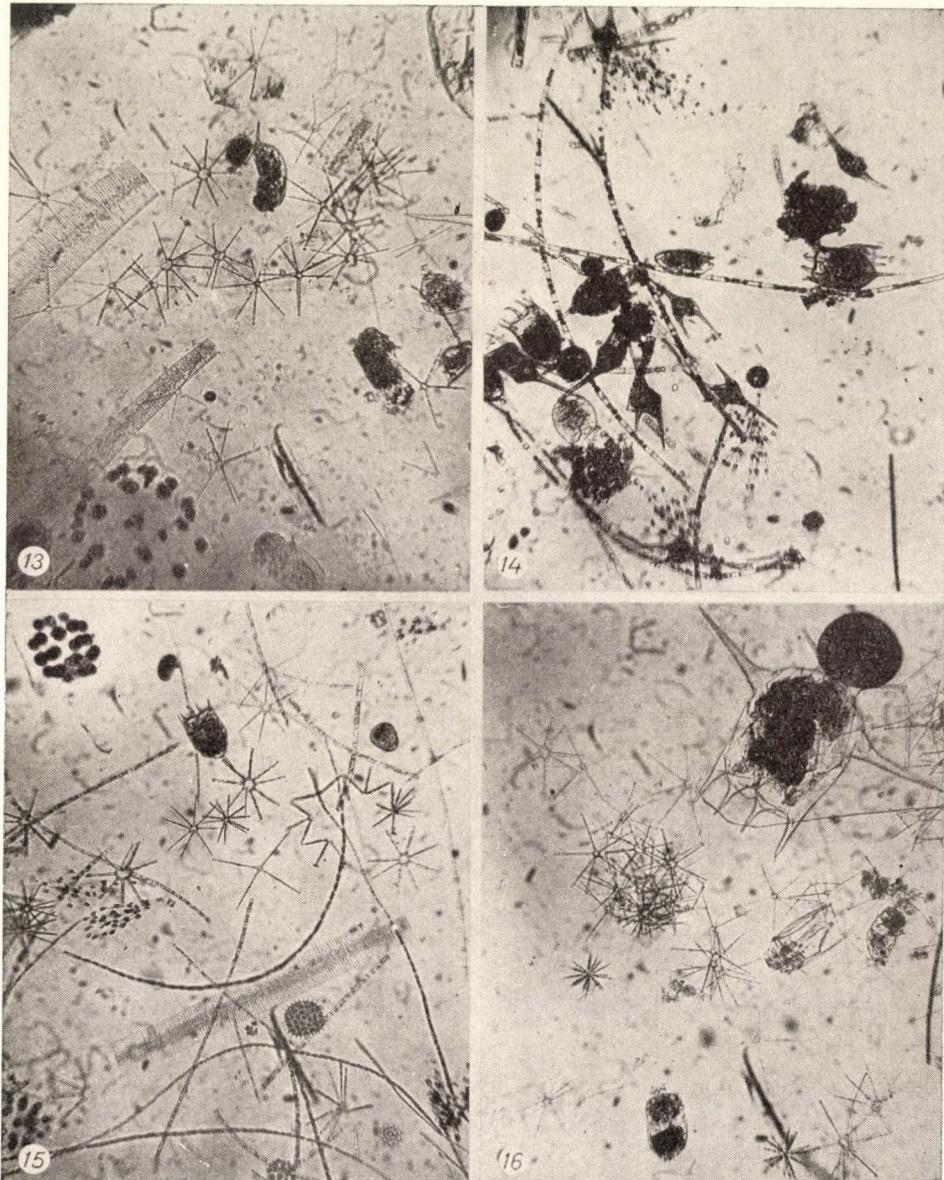
	Mikroorganismen	Zeit des Einsammelns — 1951.	Hauptarm °C 18 pH 7,7—8,4	Cserta-Donau °C 21 pH 7,9—8,4	Cserta-Alte-Donau °C 19 pH 8	Simon-Donau °C 22 pH 8	Szeremleer-Donau °C 21 pH 8—8,5	Ferenc-Kanal °C 24 pH 8
Oscillatoriaceae								
*89.	<i>Lyngbya epiphytica</i> HIERONYMUS ....	VII.					2	
90.	<i>Lyngbya lagerheimii</i> (MÖB.) GOM. ....	VII.					3	
*91.	<i>Oscillatoria lemmermannii</i> WOLOSZ. ....	V.	1—2					
92.	<i>Oscillatoria planctonica</i> WOLOSZ. ....	V. VII.		2				
93.	<i>Oscillatoria tenuis</i> AG. ....	VII.						
94.	<i>Oscillatoria</i> sp. ....	V. VII.					1—2	
*95.	<i>Romeria elegans</i> WOLOSZ. ....	VII.					1—2	
96.	<i>Spirulina abbreviata</i> LEMM. ....	VII.					2	
Fungi								
*97.	<i>Asterothrix raphidiooides</i> (REINSCH spec.) PRINTZ ....	VII.		2				2

1 — einige Exemplare. 2 — wenige Exemplare. 3 — mehrere Exemplare. 4 — viele Exemplare. 5 — sehr viele Exemplare. Die mit \* bezeichneten Arten sind für die Flora der ungarischen Donau neu.

der Cserta-Donau sind *Ceratium hirundinella* und verschiedene, zum Kreis von Chlorococcales gehörende Algenarten vorherrschend. Im Plankton der Simon-Donau (Abb. 14) kommen neben den *Asterionella*-Arten und *Anabaena sphaerica* var. *tenuis* besonders *Ceratium hirundinella* und *Dinobryon*-Arten in grösseren Mengen vor. Im Plankton des Szeremleer Donauarmes haben die *Asterionella*- und *Dinobryon*-Arten das Übergewicht (Abb. 15). Für das Plankton des Ferenc-Kanals sind die Asterionellen und dem Kreis der Chlorococcales angehörenden Algenarten charakteristisch.

Die Algengesellschaften des in den einzelnen Donauarmen vorhandenen Phytoplanktons sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Aus den Donauarmen der Umgebung von Baja kamen insgesamt 97 pflanzliche Mikroorganismusarten zum Vorschein. Diese Artenzahl ist nicht hoch, man muss aber auch den beim Einsammeln herrschenden hohen Wasserstand in Betracht ziehen. In den bearbeiteten Algenproben waren aus der Pflanzenwelt folgende Arten von Mikroorganismen zu finden. Algae: Chlorophyta 58, Euglenophyta 6, Chrysophyta 13, Pyrrrophyta 1, Cyanophyta 18 Arten; Fungi: 1 Art, insgesamt 97 Arten. Die Tabelle enthält außer den Gliedern des Phytoplanktons auch einige Arten der Periphyton- und Benthosalgen. Von den identifizierten 97 Arten kamen 32 erstmalig aus der ungarischen Donau unter die Augen (diese sind in der Tabelle mit \* bezeichnet).

Zahlreiche Algenarten waren nicht nur im Hauptarm, sondern auch in allen übrigen untersuchten Donauarmen vertreten. Als solche sind zu nennen:



*Abb. 13.* Das Plankton des Hauptarmes ( $\times 100$ ). Auf dem Bild sind massenhaft Asterionellen und andere Kieselalgenarten sichtbar, in der unteren linken Ecke ist eine sich eben teilende *Eudorina elegans*. Vom Zooplankton befinden sich in der oberen Hälfte des Bildes *Keratella cochlearis* typ. (samt Ei), rechts aussen *Brachionus angularis*, und ganz unten *Filinia brachiata*. *Abb. 14.* Das Plankton der Simon-Donau ( $\times 100$ ). Das Bild ist von *Ceratium hirundinella* und *Dinobryon*-Arten beherrscht. In der oberen linken Ecke und in der unteren Hälfte sind *Dinobryon*-Gruppen, in der Mitte *Ceratium hirundinella* zu sehen, das ganze Bild ist durch die Fäden von *Planktonema lauterbornii*, *Mougeotia* und *Zygnema* durchkreuzt. Von den Gliedern des Zooplanktons sind auf der linken Seite des Bildes *Keratella cochlearis macracantha*, weiter unten *Pompholyx complanata* und rechts *Keratella cochlearis macracantha* sichtbar

*Eudorina elegans* (Abb. 15), *Pandorina morum*, *Pediastrum boryanum* (Abb. 15), *Pediastrum duplex* var. *genuinum* (Abb. 17), *Scenedesmus quadricauda*, *Ankistrodesmus falcatus* (Abb. 26) u. a. m. Nur aus dem Hauptarm wurden folgende Algenarten bestimmt: *Ankistrodesmus convolutus*, *Coleochaete orbicularis*, *Closterium dianae*, *Oscillatoria lemmermannii* u. a. m. Folgende Arten waren nur in den Nebenarmen anzutreffen: *Dinobryon sertularia* (Abb. 20, 4), *Ceratium hirundinella* (Abb. 14, 28), *Coelastrum microporum* (Abb. 19), *Coelastrum proboscideum* (Abb. 29), *Gloeocystis ampla*, *Gloeocystis planctonica*, außerdem zahlreiche *Pediastrum*-, *Scenedesmus*-, *Euglena*-, *Phacus*-, *Dinobryon*-, *Spirulina*-, *Lyngbya*- und andere Algenarten.

Von den untersuchten Nebenarmen stehen mehrere mit dem Hauptarm in Verbindung, dieser Umstand ist die Erklärung dafür, dass sie auch mehrere Mikroorganismenarten des Strombettes enthalten. In vielen Fällen kommen sogar kälte liebende Arten im eine Temperatur von 24° C aufweisenden Wasser einiger Arme vor; diese Erscheinung deutet auch auf eine ständige Verbindung mit dem Hauptarm.

Von den schon bestimmten Algen waren 18 Arten nur im Maiplankton vorhanden; diese gehören noch der Frühjahrsflora an; so z. B. zahlreiche *Pediastrum*- und *Scenedesmus*-Arten, einige Desmidiaceen und Cyanophyceen, ferner *Asterionella formosa* u. a. m. 48 Algenarten kamen bloss im Juliplankton vor, diese sind wahrscheinlich Glieder der Sommerflora, so z. B. viele dem Kreis der Chlorococcales angehörende Arten, zahlreiche Desmidiacea- und *Dinobryon*-Arten, ferner *Synura uvella*, *Ceratium hirundinella*, *Planktonema lauterbornii*, *Euglena*- und Cyanophycea-Arten, *Astrothrix raphidioides* u. a. m. Sowohl im Mai- als auch im Juliplankton konnten folgende Mikroorganismen festgestellt werden: Eudorinen, einige Desmidiacea-Arten, *Phacus pleuronectes* (Abb. 27), *Dinobryon sertularia*, *Asterionella gracillima* und etliche Cyanophyceae.

In den Donauarmen bei Baja leben auch einige seltener Algenarten. Als solche sind zu nennen: *Eudorina illinoensis* (Abb. 22; im Hauptarm und in der Szeremleer-Donau sowie im Ferenc-Kanal), *Gloeocystis ampla* (in der Simon-Donau), *Sphaeroplea annulina* (im Hauptarm), *Oedogonium fragile*, *Zyg-nema insigne* (in der Simon-Donau), *Planktonema lauterbornii* (Abb. 14, 15; im

---

Abb. 15. Das Plankton der Szeremleer-Donau ( $\times 100$ ). In der oberen Ecke *Eudorina elegans*, auf dem ganzen Bild zerstreut *Asterionella*-Arten und andere Kieselalgen, in der Mitte links *Dinobryon*-Arten; im unteren Drittel *Pediastrum boryanum*, in der unteren rechten Ecke *Pediastrum duplex* var. *reticulatum*, am unteren Rand des Bildes *Coelastrum proboscideum* und an mehreren Stellen Fäden von *Planktonema lauterbornii*. Vom Zooplankton sind in der oberen Hälfte des Bildes *Keratella tecta*, von dieser rechts weiter entfernt eine *Difflugia* (Testacea) zu sehen. Abb. 16. Das Plankton der Cserta-Alten-Donau ( $\times 100$ ). Die Mitte des Bildes nehmen *Asterionella*-Arten ein, in seiner unteren Hälfte links ein *Actinastrum hantzschii* sichtbar. Vom Zooplankton: in der oberen rechten Ecke *Brachionus calyciflorus amphiceros* (samt Ei), weiter abwärts *Polyarthra vulgaris*, unten eine *Cephalodella*

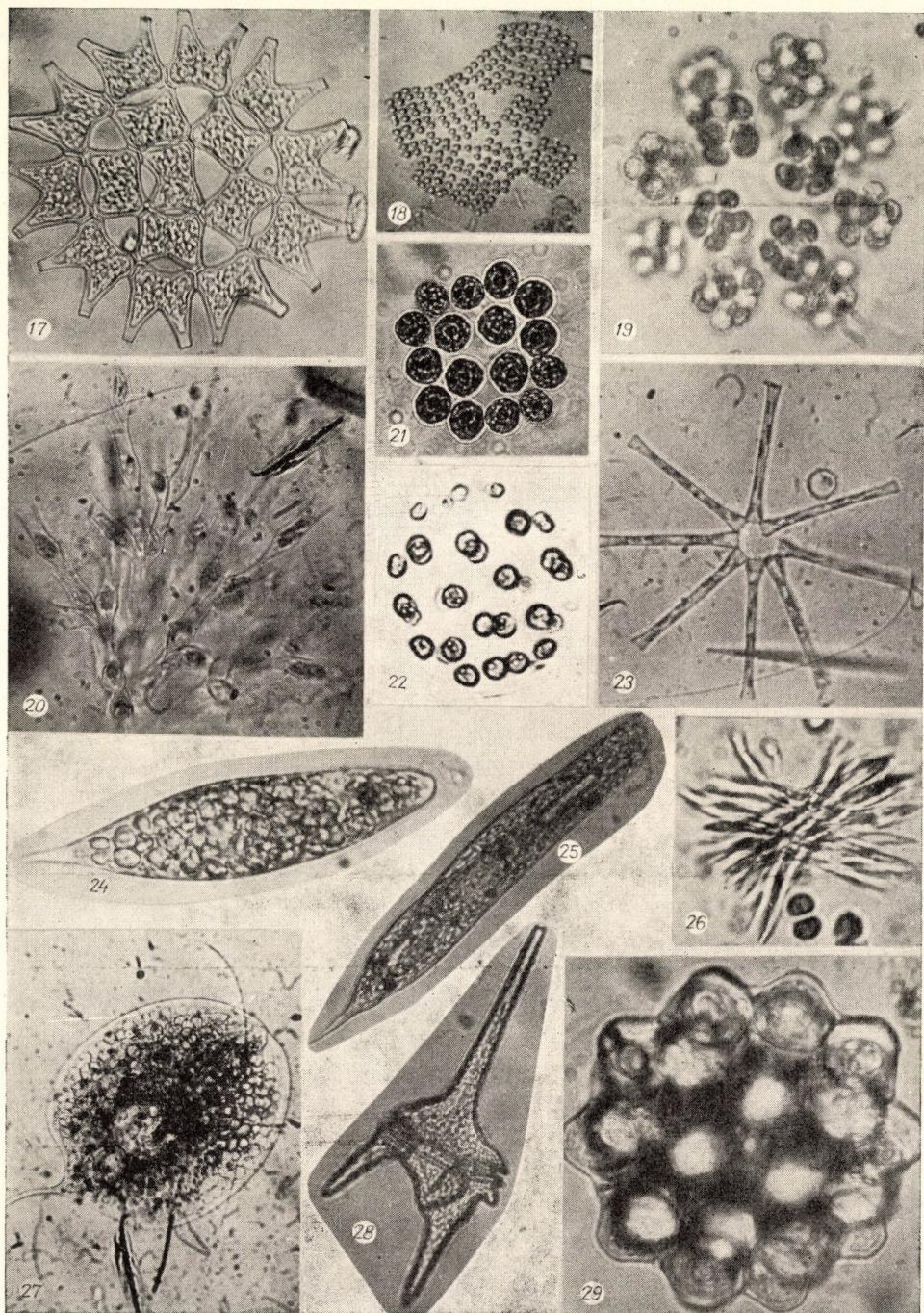


Abb. 17. *Pediastrum duplex* var. *genuinum* AL. BRAUN ( $\times 1000$ ). Abb. 18. *Merismopedia punctata* MEYEN ( $\times 500$ ). Abb. 19. *Coelastrum microporum* NAEG., Teilung der Coenobien ( $\times 1000$ ). Abb. 20. *Dinobryon sertularia* EHRENB. ( $\times 500$ ). Abb. 21. *Gonium pectorale* MÜLLER

Hauptarm, in der Simon- und Szeremleer-Donau), *Aphanisomenon gracile* (im Hauptarm), *Romeria elegans* (im Ferenc-Kanal).

Von den untersuchten Donauarmen waren die bei der Pandur Insel verlaufenden in ihrer Mikrovegetation reicher; aus der Szeremleer-Donau kamen 57, aus dem Ferenc-Kanal 52 pflanzliche Mikroorganismen zum Vorschein. Die wenigsten Algenarten — bloss 15 — befanden sich in der Cserta-Alte-Donau. Der Hauptarm lieferte 26, die Cserta-Donau 38, Simon-Donau 43 Algenarten. Der damalige andauernde hohe Wasserstand beeinträchtigte stark die Entwicklung der Mikrobiocönose des Wassers, und war mit der Grund dafür, dass sich die Mikroflora sowohl in ihren Arten als auch in der Populationsdichte als ziemlich arm erwies.

Die Zusammensetzung der Algengesellschaften in der Mikrovegetation der untersuchten Biotope ist in Abb. 2 und Tabelle 3 dargestellt.

Aus den Diagrammen ist es klar ersichtlich, dass während der Monate Mai und Juli in allen untersuchten Donauarmen die Chlorophyta-Arten dominierten; diese bildeten 51 bis 80% der Algenvegetation, die übrigen Algengruppen waren mit wesentlich geringeren Anteilen vertreten. Diese Algendiagramme kann man bei den untersuchten Donauarmen als kennzeichnend für die Frühjahrs- und Sommerperiode betrachten, da auf dieser Donaustrecke auch der hohe Wasserstand meist eine allgemeine Erscheinung ist.

Tabelle 3  
Prozentuale Verteilung der Algenarten in den einzelnen Donauarmen

	Chloro-phyta	Eugleno-phyta	Chrysophyta	Pyrrophyta	Cyanophyta
Hauptarm (Abb. 2A) .....	73	—	19	—	8
Cserta-Donau (Abb. 2B) .....	51	8	22	3	16
Cserta-Alte-Donau (Abb. 2C) .....	80	7	13	—	—
Simon-Donau (Abb. 2D) .....	68	9	17	2	4
Szeremleer-Donau (Abb. 2E) .....	59	7	16	2	16
Ferenc-Kanal (Abb. 2F) .....	72	6	6	—	16

### Das Zooplankton

Der grösste Teil des mit dem Netz eingesammelten Zooplanktons entfiel bei allen Donauarmen auf die Rotatorien, diese waren sowohl im Frühjahrs-

( $\times 1000$ ). Abb. 22. *Eudorina illinoensis* PASCHER ( $\times 250$ ). Abb. 23. *Asterionella gracillima* (HANTZSCH.) HEIBERG ( $\times 1000$ ). Abb. 24. *Euglena proxima* DANG. ( $\times 1000$ ). Abb. 25. *Euglena tripterus* (DUJ.) KLEBS ( $\times 1000$ ). Abb. 26. *Ankistrodesmus falcatus* (CORDA) RALFS ( $\times 1000$ ). Abb. 27. *Phacus pleuronectes* (O. F. M.) DUJ. ( $\times 1100$ ). Abb. 28. *Ceratium hirundinella* O. F. M. ( $\times 1000$ ), eine abweichende Form aus der Cserta-Alte-Donau. Abb. 29. *Coelastrum proboscideum* BOHL. ( $\times 1000$ )

wie Sommermaterial vorherrschend. Im Hauptarm erreichten z. B. am 28. und 29. Mai die Rotatorien 90%, die Crustaceen 10%, in der Simon-Donau und Szeremleer-Donau belief sich der Anteil dieser Arten in gleicher Weise auf 80 bzw. 20%. In der Cserta-Donau änderte sich das Verhältnis: hier waren bloss 70% Rotatorien und 30% Crustaceen vorhanden. Im Sommer verschiebt sich die Proportion zu Gunsten der Rotatorien noch mehr: am 23. bis 25. Juli befanden sich in der Cserta-Donau, Cserta-Alten-Donau und Simon-Donau 98% Rotatorien und 2% Crustaceen, in der Szeremleer-Donau war der Anteil dieser Arten 90 bzw. 10% und im Ferenc-Kanal sogar 95 bzw. 5%.

Diese Eigentümlichkeit des Planktons der Donau hatte WOYNAROVICH — anlässlich seiner in der zweiten Augusthälfte des Jahres 1943, u. zw. viel weiter südlich, vor der Mündung der Drau (Dráva) vorgenommenen Untersuchungen — ebenfalls festgestellt [21]; er kam durch quantitative Erhebungen zu dem Ergebnis, dass die Rotatorien am Mesoplankton mit 87% beteiligt sind.

Aus dem Kreise der Crustaceen waren in den Sammlungen normalerweise die Nauplius-Larven mit der grössten Menge vertreten. Die Zahl ihrer vollentwickelten Individuen ist aber i. allg. gering, auch ihre Verteilung in den einzelnen Gewässern nicht gleich. So waren z. B. im Hauptarm (28. V.) Daphnien, Bosminen und Diaptomen vorhanden. In den Nebenarmen mit langsamer fliessendem Wasser erscheinen auch die Arten *Diaphanosoma*, *Cyclops* und *Chydorus*. *Scapholebris* war nur in der Simon-Donau und Cserta-Alten-Donau, demgegenüber *Canthocamptus* während des Sommers und bloss in der Szeremleer-Donau vertreten. Im Ferenc-Kanal konnte man im Sommer neben den Bosminen zu überwiegendem Teil Diaptomen sammeln.

Ostracoden gerieten im Frühjahr und auch dann nur aus der Cserta- bzw. Simon-Donau in die Netze. Im letzteren Arm konnte man während des Frühjahrs Larven der Chironomiden finden. Fast in allen Planktonssammlungen waren auch *Veligera*-Larven von *Dreissensia polymorpha* vorhanden; die meisten dieser Lebewesen wies das aus dem Ferenc-Kanal im Sommer eingebrachte Material auf.

Es ist aber zu berücksichtigen, dass der mit einem Netz sammelnde Algologe langsam arbeitet und beim Schöpfen ein Teil der kräftiger schwimmenden Crustaceen entkommt. Das durch einen Fachmann geübte Sammeln wird wahrscheinlich andere Ergebnisse zeitigen, doch wesentlich grössere Unterschiede sind kaum zu erwarten.

Im eingebrachten Material konnten auch Ciliaten, Testaceen und Gastrotrichen beobachtet werden, diese kamen aber im Plankton nur gelegentlich vor. Aus dem Plankton des Hauptarmes (28. V.) und der Szeremleer-Donau (25. V.) gerieten schöne Exemplare von *Acineta flava* (Suctoria) in grösserer Menge in das Netz.

Das Abioeston war im eingebrachten Material meist geringfügig vertreten, störte also die mikroskopischen Untersuchungen nicht.

Die in den verschiedenen Donauarmen beobachteten Rotatorien weisen die Tabellen 4 und 5 aus. In Tabelle 4 wurden nur diejenigen Arten angeführt, die sich auch in anderen Biotopen (Teichen, Pfützen, toten Flussarmen usw.) als echte planktonische (euplanktische) Organismen erweisen. Die Aufzählung umfasst also 43 Arten, 14 Varietäten und 2 Formen (insgesamt 59 Taxons). Tabelle 5 enthält — aus rein technischen Gründen — jene Rotatorien, die in anderen Süßwasserbiotopen eher zwischen den Wasserpflanzen, am Boden der Teiche usw. leben und in das Plankton nur mitunter, passiv geraten. Die Strömung und abwaschende Kraft des Flusswassers schwemmt sie natürlich in das Plankton ein. Sie sind somit tychoplanktische und xenoplanktische Organismen. Doch die etwa 70% der in Tabelle 5 aufgezeigten Arten kamen ebenfalls aus dem Plankton zum Vorschein, in welchem einige Arten (*Euchlanis deflexa*, *E. dilatata* im Maiwasser der Cserta-Donau) mit grosser Populationsdichte vertreten waren. Die übrigen Arten wiesen nur je ein Exemplar oder einige Individuen auf, dies ist ein klarer Beweis dafür, dass sie passiv in das Plankton gerieten.

In Tabelle 5 sind 55 Arten und 3 Varietäten angeführt. Die Donauarme bei Baja enthielten also insgesamt 98 Arten, 17 Varietäten und 2 Formen.

Diese Population verteilt sich im Potamoplankton der einzelnen Gewässer nicht gleichmässig. Zur leichteren Übersicht wurde in Tabelle 6 die Verteilung der euplanktischen und tychoplanktischen Rotatoria-Arten zusammengefasst. Aus den Angaben der drei Tabellen lassen sich kurz folgende Schlüsse ziehen.

1. Im Hauptarm lebten Ende Mai 43 Rotatoria-Arten (Tab. 6). Damit steht der Hauptarm — mit den übrigen verglichen — an erster Stelle (Tab. 5). Zu dieser Zeit war *Brachionus calyciflorus* typ. die Leitform. Wenn wir noch bedenken, dass die beiden Varietäten dieser Art grosse Populationsdichte aufweisen, so stellt es sich heraus, dass sie unter den Rotatorien die Mehrheit bildeten. Neben ihnen kamen auch *Keratella cochlearis macracantha*, *Synchaeta longipes* in sehr grosser Zahl vor. Ausserdem gesellten sich noch weitere 8, an Individuen hochzählige Arten zu ihnen (Tab. 6), im Potamoplankton hatten also (die tychoplanktischen Arten mitgerechnet) 13 Arten (32,2%) das Pramat, die übrigen spielten bloss eine untergeordnete Rolle.

Im Sommer gerieten jedoch viel weniger Arten in das Netz. Vor dem Einsammeln lief eine Hochflut ab. Die Zahl der tychoplanktischen Arten (3) war zu dieser Zeit die geringste. Unter den euplanktischen Arten war die Teichform *Synchaeta oblonga* die Leitart, neben ihr hatten nur *Polyarthra minor* und *Synchaeta pectinata*, insgesamt also 3 Arten (11%) eine grössere Rolle inne. Auch diese Tatsache beweist die Artenarmut des Sommerplanktons im Hauptarm. Zahlreiche Arten, die im Frühjahr mit beträchtlichen Mengen vertreten waren, verschwanden völlig (Tab. 4).

2. Die Cserta-Donau wies schon ganz andere Verhältnisse auf. Von da kamen im Frühjahr weniger Rotatoria-Arten zum Vorschein als im Herbst.

Tabelle 4  
Die euplanktischen Rotatorien der Donau und ihrer Arme bei Baja

	Arten	Monat des Einsammelns												Zahl des Vor- kom- mens	
		Hauptarm		Cserta- Donau		Cserta- Alte- Donau		Simon- Donau		Szeremleer- Donau		Ferenc- Kanal			
		V	VII	V	VII	V	VII	V	VII	V	VII	V	VII		
1.	<i>Anuraeopsis fissa</i> GOSSE .....		1	1	1			3		1	1	2		7	
2.	<i>Ascomorpha ecaudis</i> PERTY .....	1		3		1	1	2		5	2	2	4	5	
3.	<i>Asplanchna brightwelli</i> GOSSE .....	4	2	4	2	1		1	1	5	2	2	4	11	
4.	" <i>priodonta</i> GOSSE .....	1		1	1	1		1	2	1		1	8		
5.	<i>Brachionus angularis</i> GOSSE .....	4	1	1	5	1	1	1	5	4	4	3	4	12	
*6.	" <i>bennini</i> LEISSLING .....	1				2				3		2	4		
7.	" <i>budapestinensis</i> DADAY .....			1						4	1	4		1	
*8.	" <i>v. lineatus</i> SKORIKOV .....	1		1				3		2	2	1	4	6	
9.	" <i>calyciflorus</i> PALL. typ. ....	5	1							2	2	2	3		
10.	" <i>amphiceros</i> EHRBG .....	5	2	5	2	5	5	2	2	5	5	2	3	11	
11.	" <i>anuraeiformis</i> BREHM .....	5	1	5		2		2	2	2	2	1		8	
12.	" <i>dorcas</i> GOSSE .....	1	1			1								4	
13.	" <i>falcatus</i> ZACHARIAS .....					1								1	
14.	" <i>leydigii</i> v. <i>rotundus</i> ROUSS. ....				1									1	
15.	" <i>quadridentatus</i> HERMANN .....		1	1	1						2	2	3	3	
16.	" <i>brevispinus</i> EHRBG .....	1		1	1					2	3		2	6	
17.	" <i>entzii</i> FRANCÉ .....	1		1	1							1		3	
18.	" <i>urceolaris</i> MÜLLER .....	2		2	1	4	1			2	1	1	2	9	
19.	<i>Chromogaster ovalis</i> BERGENDAL .....					2		1		1	1			3	
20.	" <i>testudo</i> LAUTERBORN .....				1					1			1	2	
21.	<i>Conochilus unicornis</i> ROUSS. ....												1	1	
22.	<i>Filinia brachiata</i> ROUSS. ....		1											1	
23.	" <i>limnetica</i> ZACHARIAS .....	2	1		2	1			1	4	5	2	3	9	
24.	" <i>longiseta</i> EHRBG .....	1	1	1	4	1			3	2	4	3	5	10	
*25.	" <i>major</i> COLDITZ .....									1	1		1	3	
26.	" <i>terminalis</i> PLATE .....										1		1	1	
27.	<i>Keratella cochlearis</i> GOSSE typ. ....	4	2	2	5	3	3	2	5	5	5	2	3	12	
*28.	" " <i>v. irregularis</i> LAUTERB. ....	1												2	
*29.	" " <i>f. connectens</i> LAUT. ....	1												1	
30.	" " <i>v. hispida</i> LAUTERB. ....							1	3					1	
*31.	" " <i>v. macracantha</i> LAUTERB. ....	5	1	1	2	2		1	4	4	1		2	10	

2\*

	Arten	Monat des Einsammelns												Zahl des Vor- kom- mens	
		Hauptarm		Cserta- Donau		Cserta- Alte- Donau		Simon- Donau		Szeremleer- Donau		Ferenc- Kanal			
		V	VII	V	VII	V	VII	V	VII	V	VII	V	VII		
*32.	<i>Keratella cochlearis</i> v. <i>macracantha</i> f. <i>micracantha</i> LAUT. ....	2						2						2	
33.	<i>Keratella tecta</i> GOSSE .....	2	1	4	4	2	2	2	5	2	2	1	2	12	
34.	„ <i>quadrata</i> MÜLLER typ. ....	4		2		2		1	2	1	1	1		9	
*35.	„ „ <i>dispersa</i> CARLIN .....			2						4	2		1	1	
*36.	„ „ <i>frenzeli</i> CARLIN .....	2				1				2			1	6	
37.	„ <i>valga</i> EHRBG .....					1					1		1	4	
38.	<i>Notholca acuminata</i> EHRBG .....	1	1	1										3	
39.	„ <i>squamula</i> MÜLL. ....	1	1								1			3	
40.	<i>Pedalia mira</i> HUDSON .....					1								1	
41.	<i>Polyarthra dolichoptera</i> IDELSON .....	4	1	1	2	1				2	2			7	
*42.	„ „ <i>aptera</i> HOOD .....					1								1	
*43.	„ „ <i>brachyptera</i> BARTOŠ .....					1							3	3	
44.	„ <i>euryptera</i> WIERZEJSKI .....					1					2		1	1	
45.	„ <i>major</i> BURCKHARDT .....											1	2	1	
46.	„ <i>minor</i> LUCKS .....	4	4	1	4	2	4	2	5	4	5			11	
*47.	„ <i>proloba</i> WULFERT .....					1				1				2	
*48.	„ <i>remata</i> SKORIKOV .....								1					1	
49.	„ <i>vulgaris</i> CARLIN .....	4	1	4	4	3	4	2	4	4	4	1	4	12	
50.	<i>Pompholyx complanata</i> GOSSE .....	2		1	4		2		4	1	1		2	8	
51.	„ <i>sulcata</i> HUDSON .....			1		1			1					3	
52.	<i>Schizocerca diversicornis</i> DADAY .....	1		1				1						3	
53.	<i>Synchaeta grandis</i> ZACHARIAS .....	1						1						3	
54.	„ <i>longipes</i> GOSSE .....	5	1	1	4			4				1	5	7	
55.	„ <i>oblonga</i> EHRBG .....	2	5	1	1	2	4		2	2	2		2	10	
56.	„ <i>pectinata</i> EHRBG .....	4	4	4	4	1	1		3	4	4	1	2	11	
57.	„ <i>stylata</i> WIERZEJSKI .....	2	2	3	1	3			2		5		4	8	
58.	<i>Trichocerca pusilla</i> JENNINGS .....					4		1		3	1			3	
59.	„ <i>stylata</i> GOSSE .....					4			4		3		1	5	
Insgesamt .....		35	24	26	34	23	14	14	26	23	36	15	31		

1 — einige Exemplare. 2 — wenige (5—6) Exemplare. 3 — ziemlich viele (bis etwa 20) Exemplare. 4 — viele Exemplare.  
 5 — sehr viele Exemplare. Fett gedruckte Ziffer — Leitform. \* — neue Form für die Fauna Ungarns.

Tabelle 5

## Die tychoplanktischen Rotatorien der Donau und ihrer Arme bei Baja

	Arten	Monat des Einsammelns												Zahl des Vor- kom- mens	
		Hauptarm		Cserta- Donau		Cserta- Alte- Donau		Simon- Donau		Szeremleer Donau		Feren- Kanal			
		V	VII	V	VII	V	VII	V	VII	V	VII	V	VII		
1.	<i>Cephalodella auriculata</i> MÜLLER .....			1		1	2			1				5	
2.	" <i>catellina</i> MÜLLER .....	1		1		1	1	2	4	1	2			8	
3.	" <i>eva</i> GOSSE .....					1		1	1					4	
4.	" <i>exigua</i> GOSSE .....							1	1					3	
5.	" <i>forficula</i> EHRBG .....							1						1	
6.	" <i>gibba</i> EHRBG .....									1				2	
7.	" <i>gracilis</i> EHRBG .....					1	1	2	1		1			5	
8.	" <i>tenuior</i> GOSSE .....					1	1	1	1	1	2			2	
9.	" <i>ventripes</i> DIXON—NUTTALL .....					1	1	1	1		1			7	
10.	<i>Collotheca mutabilis</i> HUDSON .....													1	
11.	<i>Colurella adriatica</i> EHRBG .....													4	
12.	" <i>bicuspidata</i> EHRBG .....					1		1	1		1			3	
13.	" <i>deflexa</i> GOSSE .....									1				2	
14.	<i>Dicranophorus uncinatus</i> MILNE .....	1												1	
15.	<i>Dissotrocha aculeata</i> EHRBG .....													2	
16.	<i>Euchlanis deflexa</i> GOSSE .....	1	1	4	1			2	1	1	1		1	9	
17.	" <i>dilatata</i> EHRBG .....	1		4		1		2	1		1	1		8	
18.	" <i>orophila</i> GOSSE .....			1				1			1			3	
19.	" <i>parva</i> ROUSSELET .....										1			2	
20.	" <i>triquetra</i> EHRBG .....							2	1	1	1			4	
21.	<i>Itura aurita</i> EHRBG .....							1						1	
22.	<i>Lecane clara</i> BRYCE .....					1								2	
23.	" <i>luna</i> MÜLLER .....					1	1			1	1	2	1	7	
*24.	" " <i>v. praesumpta</i> AHLSTRÖM .....			2		1	1							1	
25.	" <i>nana</i> MURRAY .....											1		1	
26.	" <i>ungulata</i> GOSSE .....			1								1		2	
27.	<i>Lepadella ovalis</i> MÜLLER .....					1	1		1	1	2	3	1	6	
28.	" <i>patella</i> MÜLLER .....			2	1			2	1		1			6	
29.	<i>Lophocharis oxysternon</i> GOSSE .....								1					1	
30.	<i>Monostyla arcuata</i> BRYCE .....					2		1		1	1			1	
31.	" <i>bulla</i> GOSSE .....							1		1	1			5	

	Arten	Monat des Einsammelns												Zahl des Vor- kom- mens	
		Hauptarm		Cserta- Donau		Cserta- Alte- Donau		Simon- Donau		Szeremleer Donau		Ferenc- Kanal			
		V	VII	V	VII	V	VII	V	VII	V	VII	V	VII		
32.	<i>Monostyla closterocerca</i> SCHMARDА .....				1				3	1	1			4	
33.	" <i>cornuta</i> MÜLLER .....											1	1	1	
34.	" <i>pyriformis</i> DADAY .....			1					1			1	1	1	
35.	" <i>quadridentata</i> EHRBG .....													1	
36.	<i>Mytilina mucronata</i> v. <i>spinigera</i> EHRBG .....													1	
37.	<i>Notommata aurita</i> MÜLLER .....									1				1	
38.	<i>Philodina citrina</i> EHRBG .....							1						1	
39.	" <i>megalotrocha</i> EHRBG .....						2							1	
40.	<i>Platyias patulus</i> MÜLLER .....		1	1										1	
41.	" <i>quadricornis</i> EHRBG .....													1	
42.	<i>Rotaria citrina</i> EHRBG .....	1									2	4	3	3	
43.	" <i>rotatoria</i> PALLAS .....									1	2	1	3	4	
44.	<i>Scaridium longicaudum</i> MÜLLER .....			1	1									1	
45.	<i>Squatinella lamellaris</i> MÜLLER .....					2								2	
46.	<i>Testudinella mucronata</i> GOSSE .....													1	
47.	" <i>patina</i> HERMANN .....		1	1	1				1	1	1			6	
48.	" v. <i>intermedia</i> ANDERSON .....								1	1	1			2	
49.	<i>Trichocerca</i> ( <i>Diurella</i> ) <i>collaris</i> ROUSSELET .....											1		1	
50.	" <i>cylindrica</i> IMHOFF .....								1					2	
51.	" <i>elongata</i> GOSSE .....					1				1				3	
52.	" <i>longiseta</i> SCHRANK .....								1					1	
53.	" ( <i>Diurella</i> ) <i>porcellus</i> GOSSE .....				1					1				4	
54.	" <i>rattus</i> MÜLLER .....				1					1				3	
55.	" <i>similis</i> WIERZ. .....					1			2	1		1		1	
56.	" ( <i>Diurella</i> ) <i>tigris</i> MÜLLER .....					1		2	1		1			5	
57.	<i>Trichotria</i> <i>pocillium</i> MÜLLER .....	1							2		1			3	
58.	" <i>tetractis</i> EHRBG .....	1												1	
Insgesamt .....		8	3	12	16	8	7	17	27	12	31	6	18		

1 — einige Exemplare. 2 — wenige (5—6) Exemplare. 3 — ziemlich viele (bis etwa 20) Exemplare. 4 — viele Exemplare.  
 \* — neue Form für die Fauna Ungarns.

Auch die Zahl der tychoplanktischen Arten war viel grösser. Unter den euplanktischen Arten erhob sich *Brachionus calyciflorus amphiceros* zur Leitform. Es musste aber als eine sonderbare Erscheinung verzeichnet werden, dass von der typischen Form, die — wie bereits erwähnt wurde — im Hauptarm als Leitform auftrat, kein einziges Exemplar vorkam. Die Varietät »anuraeiformis« dieser Art hatte sehr viele Vertreter. Ausser diesen Formen wurden noch weitere 4 Arten hochzählig angetroffen. Auch zwei tychoplanktische *Euchlanis*-Arten waren massenhaft vorzufinden. Es hatten also bloss 8 Arten (21%) eine bedeutende Rolle.

Im Sommerplankton war schon *Keratella cochlearis* typ. die Leitform. Die Zahl ihrer Frühjahrsgefährten verringerte sich beträchtlich. Neben ihr traten *Brachionus angularis* und 9 andere Arten mengenweise auf (Tab. 4). Da die tychoplanktischen Arten zahlenmässig kaum ins Gewicht fielen, kann von den erwähnten 11 Arten (22%) gesagt werden, dass sie mit ihrer Masse eine bedeutende Rolle im Plankton spielten.

3. In der Cserta-Alten-Donau waren die Verhältnisse denen des Hauptarmes ähnlich: im Frühjahr zeigten sich mehr, im Sommer weniger Rotatoria-Arten. Dies offenbarte sich besonders in der Zahl der euplanktischen Arten. *Brachionus calyciflorus amphiceros* war — ziemlich als Sonderfall zu betrachten — auch hier, sowohl im Frühjahr wie im Sommer, die Leitform. Neben ihr treten nicht »sehr viele« Arten auf, bloss eine einzige war mit grösserer Populationsdichte vertreten. Demgemäss hatten also in diesem Arm während des Frühjahrs nur 2 Arten (6,4%) eine wichtigere Rolle.

Im Sommer konnten ausser der Leitform noch 3 andere Arten mit höherer Individuenzahl gesammelt werden, mit diesen kann man also insgesamt 4 Arten (19%) eine grössere Bedeutung zugestehen. Von den tychoplanktischen Arten waren sowohl im Frühjahr als auch im Sommer nur wenige und höchstens in 1 bis 2 Exemplaren vorhanden.

4. Die Simon-Donau war an Rotatorien schon etwas reicher, im Mai wiesen sie viel weniger Arten als im Sommer auf. Die tychoplanktischen Arten übertrafen zahlenmässig in beiden Perioden die euplanktischen; dies ist in den Bajaer Donauarmen eine einzig dastehende Erscheinung, die zufolge der langsam Wasserbewegung in hohem Masse auf einen lakustrischen Charakter deutet.

Im Mai wies bloss *Synchaeta longipes* zahlreiche Exemplare auf (3,2%), deshalb kann sie als Leitform betrachtet werden, obwohl ihre Rolle kleiner als die der in den übrigen Armen beobachteten Leitarten ist. Im Juli erschienen schon zahlreiche Arten und unter diesen war *Keratella cochlearis* typ. die typische Leitform. Neben ihr kamen 3 weitere Arten mit sehr grosser und 4 mit grosser Populationsdichte vor, so dass im Plankton dieses Armes insgesamt 8 Arten (15%) eine bedeutende Rolle spielten.

5. Die Szeremleer-Donau ist unter allen Donauarmen sowohl an Arten als auch an der Menge dieser die reichste und mannigfaltigste. Im Frühjahr

beherbergt sie wesentlich weniger Rotatoria-Arten als während des Sommers. Im Mai ist *Keratella cochlearis* die Leitform; sie hatte auch im Juli eine grosse Populationsdichte, musste jedoch ihre Rolle im Sommer an *Brachionus calyciflorus amphiceros* abtreten. Ausser ihr waren im Mai noch *Asplanchna brightwelli* und *Brachionus calyciflorus amphiceros* sehr zahlreich vertreten. Neben diesen Arten hatten auch 7 andere eine grosse Populationsdichte, so dass von den euplanktischen Arten der Szeremleer-Donau die gewaltige Masse von 10 Arten (35%!) vorherrschend war, da die tychoplanktischen Arten meist nur wenige Exemplare aufwiesen.

Im Sommer waren neben der Leitform *Filinia limnetica*, *Keratella cochlearis*, *Polyartra minor* und *Synchaeta stylata* in sehr grosser Zahl vorhanden. Ausser diesen gab es noch 5 euplanktische Arten und eine tychoplanktische, den Grossteil der Rotatorien haben also insgesamt 11 Arten (16,2%) bestritten. Im Gegensatz zu den übrigen enthielt dieser Donauarm die meisten tychoplanktischen Rotatorien-Arten, welche jedoch zum überwiegenden Teil nur einige Exemplare aufwiesen.

6. Das Rotatorienplankton des Ferenc-Kanals ist — mit dem der übrigen Donauarme verglichen — sehr ärmlich. Die Zahl der Arten war im Frühjahr am geringsten, stieg aber im Sommer auf mehr als das Doppelte. Im Juli erhöhte sich beträchtlich die Zahl sowohl der euplanktischen als auch der tychoplanktischen Arten. Im Frühjahr konnte keine Art mit grösserer Populationsdichte beobachtet werden, im Sommer vermehrte sich jedoch die einen starken lakustrischen Charakter zeigende *Filinia longiseta* zur Leitform. Ausser ihr hatte *Synchaeta longipes* sehr viele Individuen, ferner wiesen 5 andere euplanktische Arten und eine tychoplanktische grössere Mengen auf, so dass insgesamt 8 Arten (16,3%) eine grosse Rolle im Plankton zuzuschreiben war. Die Rotatorienfauna des Ferenc-Kanals hat schon einen ausgeprägten Teichcharakter.

In den untersuchten Donauarmen sind also folgende Arten die Leitformen. Während des Frühjahrs: *Brachionus calyciflorus* typ., *Br. calyciflorus amphiceros* (in zwei Fällen) und *Keratella cochlearis* typ.; im Sommer: *Synchaeta oblonga*, *Keratella cochlearis* typ. (in zwei Fällen), *Brachionus calyciflorus amphiceros* (in 2 Fällen) und *Filinia longiseta*. Im Frühjahr traten also in den 6 Donauarmen 3 Arten bzw. Varietäten und im Sommer 4 Arten bzw. Varietäten als Leitformen auf.

Die Rotatorienfauna des Planktons der 6 Donauarme (die Subbiotopen hinzugerechnet) weist ziemlich grosse Unterschiede auf. Dies deutet zweifelsfrei auf die ökologische Verschiedenheit der einzelnen Arme hin, was auch aus den Angaben der Leitformen ersichtlich ist. Man kann also sagen, dass die untersuchten Donauarme bezüglich ihres Mesoplanktons sowohl im Frühjahr als auch im Sommer selbständig sind, ihre Individualität gut ausgeprägt ist, obwohl sie durch ihr Wasser mehr oder minder in Verbindung miteinander stehen.

Aus den Daten der Tabellen 4 und 5 kann man weiters feststellen, welche Arten im Frühjahr oder bloss im Sommer und welche in beiden Jahreszeiten die einzelnen Arme belebten. Man kann also sagen, dass die verschiedenen Arme des Stromes gerade unter dem Einfluss ihrer Wassermenge, des mechanischen Effektes der Strömung und zufolge der ständigen Temperaturschwankungen das Bild ihrer Rotatorienfauna voneinander abweichend gestalten. In diesem Wandel spielt aber das eigenartige ökologische Anpassungsvermögen der einzelnen Arten eine wichtige Rolle, deren Einzelheiten jedoch noch nicht genau bekannt sind. Die Leitformen und die »hochzähligen« Arten haben sich aber zweifellos gut an das Flusswasser angepasst. *Brachionus calyciflorus amphiceros* lebt z. B. in den Teichen hauptsächlich zur Sommerzeit; demgegenüber ist *Keratella cochlearis macracantha* im Plattensee streng ein Wintertierchen, das auch unter der Eisdecke viele Exemplare aufweist, während es in der Donau — vorwiegend im Hauptarm — sowohl im Frühjahr als auch im Sommer mit zahlreichen oder wenigen Individuen vertreten erscheint. *Synchaeta stylata* ist in den Teichen Ungarns ziemlich selten, in den Donauarmen jedoch zu beiden Jahreszeiten recht häufig; ihre im Wasser schwebenden, charakteristischen, auf die Heliozoen erinnernden Eier mit strahlenförmig angeordneten langen Borsten kann man massenweise vorfinden.

Tabelle 6

Gesamtzahl der Rotatorien-Arten in den verschiedenen Donauarmen

	Monat des Einsammelns					
	Hauptarm		Cserta-Alte-Donau		Cserta-Alte-Donau	
	V	VII	V	VII	V	VII
Euplanktische Arten (Tab. 4)	35	24	26	34	23	14
Tychoplanktische Arten (Tab. 5)	8	3	12	16	8	7
Zusammen	43	27	38	50	31	21

	Monat des Einsammelns					
	Simon-Donau		Szeremleer-Donau		Ferenc-Kanal	
	V	VII	V	VII	V	VII
Euplanktische Arten (Tab. 4)	14	26	23	36	15	31
Tychoplanktische Arten (Tab. 5)	17	27	12	31	6	18
Zusammen	31	53	35	67	21	49

Diese wenigen Beispiele wurden nur erwähnt, um auf die eigenartigen Wirkungen der Bajaer Donauarme und auf die ökologischen Verhältnisse ein-

zelner Rotatoria-Arten hinzzuweisen. Die Frage jedoch, warum gewisse Arten zur selben Zeit in dem einen Donauarm — oft in grossen Mengen — vorhanden sind und aus einem anderen fehlen, kann nur in Kenntnis weiterer ökologischer Faktoren beantwortet werden. Diese Eigentümlichkeit — wie bereits erwähnt wurde — weist auch das Phytoplankton auf.

In der letzten Spalte der Tabellen 4 und 5 ist auch die Häufigkeitszahl angegeben, die besagt, wie oft die eingesammelte Art in der Biozönose der untersuchten Donauarme während der Monate Mai und Juli vorgefunden wurde. Zur besseren Übersicht gibt hierüber Tabelle 7 zusammenfassend Aufschluss.

Tabelle 7

*Häufigkeit der Rotatorien in den untersuchten Donauarmen*

Häufigkeit (Fälle des Vorkommens)	Euplanktische Arten (Tabelle 4)	Tychoplanktische Arten (Tabelle 5)
12	4	—
11	4	—
10	3	—
9	3	1
8	4	2
7	3	2
6	3	3
5	2	4
4	3	6
3	12	7
2	5	10
1	13	23
Insgesamt	59	58

Aus der Tabelle ist es also ersichtlich, dass in 12 (d. h. allen) Fällen 4 Arten (3,3%) — mehr oder minder reich an der Zahl ihrer Individuen — vorhanden waren, u. zw.: *Brachionus angularis*, *Keratella cochlearis* typ., *Keratella tecta* und *Polyarthra vulgaris*. In 11 Fällen konnten ebenfalls 4 und in 10 Fällen 3 Arten (Tabellen 4 u. 5) eingesammelt werden (2,5%). Diese Arten sind ausnahmslos euplanktisch. Von den tychoplanktischen Arten kam nur *Euchlanis deflexa* — meist mit 1 bis 2 Exemplaren — in 9 Fällen unter die Augen; *Cephalodella catellina* und *Euchlanis dilatata* konnten 8mal eingesammelt werden. Nur in einem einzigen Falle gerieten 13 euplanktische (23,3%) und 23 tychoplanktische Arten (39,6%) in das Netz (Tab. 7).

Diese Angaben beweisen, dass in der Lebensgemeinschaft der Bajaer Donauarme etwa 10 Rotatoria-Arten (8,5%) mit ihrer massenhaften Erschei-

nung die Hauptrolle tragen. Den übrigen kommt nur eine untergeordnete Bedeutung zu. Es steht auch fest, dass in das Wasser der Donau sehr viele Arten aus den am Ufer gelegenen Biotopen, den kleineren und stilleren, eher teichähnlichen Gewässern (den sog. lenitischen Uferflächen) geschwemmt werden. Viele Arten geraten aber auch aus den Bächen, Nebenflüssen — die das Wasser der stehenden Gewässer, Teiche, Pfützen und damit auch die Lebewesen dieser mit sich führen — in die Donau. Das Potamoplankton dieses Stromes ist also auch hinsichtlich der Rotatorien gemischt. Es kann aber als bewiesen angesehen werden, dass viele Arten im Wasser der Donau günstige ökologische Bedingungen vorfinden und sich beträchtlich vermehren. Die Frage jedoch, welche von diesen die euzönischen und welche die tychozönischen Arten sind, könnte nur auf Grund weiterer Untersuchungen geklärt werden.

Es ist eine interessante Erscheinung, dass im Plankton der Donauarme viele Arten stark variieren, dies hängt wahrscheinlich mit den eigenartigen, mannigfaltigen und stets wechselnden ökologischen Verhältnissen des Stromwassers zusammen. Solche Arten sind meist euplanktisch (Tab. 4). Eine derart hohe Zahl an Varietäten kommt z. B. im Plattensee nicht vor.

Aus den untersuchten Donauarmen wurden auch solche Rotatoria-Arten und -Varietäten eingesammelt, die aus unseren inländischen Gewässern bislang unbekannt waren. Diese sind wie folgt: *Brachionus bennini*, *Br. budapestinensis lineatus*, *Filinia major*, *Keratella cochlearis irregularis*, *K. cochlearis irregularis connectens*, *K. cochlearis micracantha*, *K. quadrata dispersa*, *K. quadrata frenzeli*, *Lecane luna praesumpta*, *Polyarthra dolichoptera aptera*, *P. dolichoptera brachyptera*, *P. proloba* und *P. remata*, insgesamt also 13 Arten bzw. Varietäten und Formen. Eine eingehendere ökologische, systematische und taxonomische Beschreibung dieser sowie anderer interessanter Rotatoria-Arten wird in einer späteren Abhandlung geboten, in welcher die Beobachtungen eine tiefgreifende Auswertung erfahren sollen.

Vergleicht man die Rotatorienfauna der Bajaer Donauarme mit den Angaben der Mikroflora, so kann i. allg. festgestellt werden, dass die massenhafte Erscheinung der Rotatorien zur derselben Zeit erfolgt, als die kleinsten Arten von Chlorococcales, Conjugales, Chrysophyceae, Bacillariophyceae und Chroococcales ebenfalls in grösseren Mengen auftreten. Diese pflanzlichen Mikroorganismen dienen vielen eu- und tychoplanktischen Arten als Nahrung. Die Prüfung des Darminhaltes erbrachte jedoch den Beweis, dass die in den Donauarmen lebenden Rotatorien auch die vom Wasser getragene feine organische Substanz (Detritus) zu ihrer Ernährung in Anspruch nehmen. Räuberische Arten gibt es unter den Rotatorien nur wenige, als wichtigste ist *Asplanchna brightwelli* zu nennen, die sich auch massenhaft vermehrt und viele kleinere Tiere, besonders winzige Rotatorien verzehrt. Ein Beweis hierfür ist, dass von dieser Art auch 700 bis 800  $\mu$  lange Exemplare in den Bajaer Donauarmen leben.

### Diskussion

Die Donau teilt sich innerhalb der Grenzen Ungarns nirgends auf so viele und nahe zueinander befindlichen Arme als in der Umgebung von Baja. Diese Arme sind hydrographisch grösstenteils in Verbindung miteinander bzw. mit dem Hauptarm. Je höher also der Wasserstand des letzteren, um so schneller fliesst das Wasser in den Nebenarmen. Bei niedrigem Wasserstand führen auch diese weniger und mit verminderter Schnelligkeit Wasser.

Das Potamoplankton des Hauptarmes und seiner Nebenarme bestand im Mai und Juli 1951 überwiegend aus Algen und Rotatorien. Zur Zeit beider Sammelarbeiten herrschte hoher Wasserstand. Trotzdem war das Phyto- und Zooplankton in gleicher Weise ziemlich reich und mannigfaltig. Im Phytoplankton des Hauptarmes und der mit ihm unmittelbarsten verbundenen Cserta-Alten-Donau dominierten — neben anderen Kieselalgen — die *Asterionella*-Arten. Die Rotatorien des Zooplanktons erwiesen sich auch als recht ähnlich, die Zahl der Arten war im Frühjahr grösser, im Sommer kleiner, obwohl als Leitform nicht dieselbe Art auftrat.

Im Phytoplankton der bedeutend schmäleren Cserta-Donau führten *Ceratium hirundinella* und verschiedene, zu Chlorococcales gehörende Algenarten das Pramat, die Rotatorien hatten im Sommer eine höhere Artenzahl als im Frühjahr. Dieser Arm wies schon etwas mehr lakustrische Arten auf, stellenweise entwickelte sich eine üppige makrophytische Flora in ihm.

Im Phytoplankton der aus der Cserta-Alten-Donau abzweigenden und weiter nach Süden in den Hauptarm mündenden Simon-Donau waren — neben Asterionellen und *Anabaena sphaerica* var. *tenuis* — die verschiedenen *Dinobryon*-Arten und *Ceratium hirundinella* vorherrschend. Ihre dominierende Rotatorienfauna zeugt auch dafür, dass dieser Arm schon in höherem Masse den Teichcharakter aufweist. Im Mai war die Zahl der Arten viel geringer als im Juli, und als bezeichnendster Zug soll erwähnt werden, dass die tychoplanktischen Arten zahlenmäßig in beiden Perioden die euplanktischen übertrafen. Diese Tatsache beweist wiederum, dass je schneller in einem Donauarm das Wasser fliesst, um so mehr tychoplanktische Arten darin verbleiben können.

Die ebenfalls schmale Szeremleer-Donau (Sugovica) ist — vom Hauptarm abgesehen — der längste Donauarm. Sie schlängelt sich bis Baja, umfliesst die Pandur Insel. Dieser Arm nimmt die Abwässer der Stadt Baja auf und aus ihm zweigt der Ferenc-Kanal ab, während er von Westen einen anderen Arm unmittelbar aus dem Hauptarm aufnimmt. Sein Wasser steht also unter dem Einfluss besonderer ökologischer Wirkungen, demgemäss ist sowohl dessen Phytoplankton als auch das Zooplankton sehr reich und mannigfaltig. Von den insgesamt 97 Arten der pflanzlichen Mikroorganismen, die aus allen untersuchten Donauarmen eingesammelt werden konnten, waren 57 Arten (58,8%)

hier vorhanden. Als Leitformen traten die Asterionellen und *Dinobryon*-Arten auf. Die Rotatorienfauna dieses Wasserlaufes ist sowohl an Arten als auch der Menge nach unter allen Donauarmen am reichsten und mannigfältigsten. Im Frühjahr leben hier viel weniger Rotatoria-Arten als im Sommer. Auch die Zahl der tychoplanktischen Arten ist in diesem Arm am höchsten.

Der Ferenc-Kanal ist vom Hauptarm schon weit entfernt. Sein Potamoplankton ist aber in vielen Beziehungen mit dem Plankton der übrigen Donauarme verwandt. Im Phytoplankton waren die Asterionellen und die in den Kreis der Chlorococcales gehörenden Algenarten vorherrschend. Das Rotatorienplankton des Kanals ist — mit dem der übrigen Donauarme verglichen — sehr ärmlich. Im Frühjahr leben in seinem Wasser weniger Arten, die Zahl dieser übersteigt jedoch im Sommer das Doppelte des Frühjahrsaspektes, wobei die einen ausgeprägten lakustrischen Charakter aufweisende *Filina longiseta* die Leitform ist.

Für die im Zooplankton herrschenden Rotatorien ist es also kennzeichnend, dass im rasch fliessenden Hauptarm und in der mit ihm in enger hydrologischer Verbindung stehenden Cserta-Alten-Donau zur Frühjahrszeit bedeutend mehr ihrer Arten leben als während des Sommers. Im Potamoplankton der schmäleren und langsamer fliessenden übrigen Nebenarme sind die Verhältnisse gerade umgekehrt. Diese Erscheinung kann auf die Geschwindigkeit der Flut zurückgeführt werden. Die Geschwindigkeit des fliessenden Wassers ist demnach bei der Entwicklung des Potamoplanktons auch in den Bajaer Donauarmen ein wichtiger ökologischer Faktor.

Im Phytoplankton der untersuchten 6 Donauarme besasssen die zur Chlorophyta-Gruppe gehörenden Arten eine 50- bis 80%ige Dominanz. Als nächste folgten die Gruppen der Chrysophyta und Cyanophyta. Das massenhafte Auftreten der Rotatorien fiel i. allg. mit dem massenhaften Erscheinen der kleinsten Arten der Conjugales, Chrysophyceae, Bacillariophyceae und Chlorococcales, die hauptsächlich dem Kreis der euplanktischen Arten angehören, zusammen. Diese sowie der im Wasser schwebende feine organische Detritus bilden die Hauptnahrung der Rotatorien der Donau. Räuberische Rotatorien-Arten gibt es sehr wenige. Als wichtigste dieser ist *Asplanchna brigthwelli* zu nennen, die in den Donauarmen eine aussergewöhnliche Länge von 700 bis 800  $\mu$  erreicht. Sie überfällt und verzehrt ohne Wahl alle kleinen Rotatoria-Arten.

Sowohl im Phyto- als auch im Zooplankton wurden zahlreich solche Arten vorgefunden, die in anderen stehenden Gewässern Ungarns nur im Winter oder bloss im Sommer zu verzeichnen, d. h. kalt- oder warmstenotherme Arten sind. Im Potamoplankton der Donauarme erschienen sie jedoch zur Frühjahrs- und Sommerzeit in gleicher Weise. Diese Tatsache kann nur mit den im Flusswasser herrschenden, sehr mannigfältigen und ständig wechselnden ökologischen Verhältnissen erklärt werden. Die Menge, chemische Beschaffenheit und

Temperatur des Wassers sowie die Geschwindigkeit der Flutwelle und die Strömung ändern sich in diesen Armen rasch.

Die Frage, warum gewisse Arten — oft in grossen Mengen — zur selben Zeit in einem Donauarm vorhanden sind und aus einem andern fehlen, wird man nur nach einer gründlicheren und eingehenderen Erforschung der ökologischen Faktoren beantworten können.

Im Potamoplankton der untersuchten Donauarme kommen viele stark variierende Rotatorien vor, die hauptsächlich dem Kreis der euplanktischen Arten angehören. Diese Erscheinung hängt wahrscheinlich ebenfalls mit den eigenartigen, mannigfaltigen und ständig wechselnden ökologischen Verhältnissen des Stromwassers zusammen. Es ist bezeichnend, dass ein grosser Teil der euplanktischen Arten je einer Gattung angehört, d. h. jede Gattung sehr viel Arten aufweist.

Unter den Arten, die aus dem Phyto- und Zooplankton der Donauarme eingesammelt wurden, gibt es auch solche, die sehr selten sind und bisher aus der Donau noch nicht zum Vorschein kamen.

Verfasser hoffen, dass ihre Angaben zu der mit grossem Schwung angebahnten internationalen Donauforschung beigetragen haben. Es soll jedoch betont werden, dass die Ergebnisse aus einer vor fast 10 Jahren durchgeföhrten Sammeltätigkeit gewonnen wurden, sie können daher zum Vergleich mit den Daten künftiger Untersuchungen dienen.

#### LITERATUR

1. BECK, G., ZAHLBRUCKNER, A. (1904—1932) Kryptogamae Exsiccatae. *Ann. D. K. K. Naturhist. Hofmuseums*, Cent. **1—26**.
2. BORBÁS, V. (1879), Budapest és környékének növényzete. Die Pflanzenwelt von Budapest und Umgebung. *Magyar orv. és Term. tud. vizsg. 1879. évi...* Budapest monographiája, 32. (Ungarisch.)
3. CHOLNOKY, B. (1922), Adatok Budapest Bacillariának elterjedése ismeretéhez. Beiträge zur Kenntnis der Verbreitung der Bacillarien von Budapest. *Bot. Közl.*, **20**, 66—79.
4. DUDICH, E., KOL., E. (1959), Kurzberichte über die Ergebnisse der biologischen Donauforschungen in Ungarn bis 1957. Danubiala Hungarica I. *Acta Zool. Hung.*, **5**, 331—339.
5. ÉBER, Z. (1955), A Kárpátmedence folyóinak planktonja. Das Plankton der Flüsse des Karpatenbeckens. *Hidrol. Közl.*, **35**, 66—72.
6. ENTZ, G. (1931), Bemerkungen über das Protistenplankton der Umgebung von Budapest. *Verh. Intern. Ver. Limnologie*, **5**, 462—487.
7. ENTZ, G. (1941), Hidrobiológiai irodalom jegyzéke. Verzeichnis der hydrobiologischen Literatur. *Hidrol. Közl.*, **20**, 1—14. (Ungarisch.)
8. FILARSZKY, N. (1893), A Chara-félék tekintettel a magyarországi fajokra. Die Characeen (Characeae L. Cl. Richard) mit besonderer Rücksicht auf die in Ungarn beobachteten Arten. Budapest. 1—129.
9. *Flora Hungarica exsiccata*. A sectione botanica Musei Nat. Hungarici edita. Centuria **1—10**, 1912—1932.
10. HALÁSZ, M. (1936), Adatok a soroksári Dunaág algavegetációjának ismeretéhez. Daten zur Kenntnis der Algenvegetation des Soroksárer Donauarmes. *Bot. Közl.*, **23**, 139—181. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
11. HALÁSZ, M. (1937), A soroksári Dunaág Bacillariái. I. Die Bacillariaceen des Soroksárer Donauarmes. I. *Bot. Közl.*, **24**, 204—222. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
12. ISTVÁNFIFI, Gy. (1891), Kitaibel herbariumának algái. Les Algues d'herbier Kitaibel. *Term. rajzi Füzetek*, **14**, 1—15. (Ungarisch, französische Zusammenfassung.)

3. KREPUSKA, Gy. (1917), Budapest végénnyei. Die Protozoen von Budapest. *Állatt. Közl.*, **16**, 86—116. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
14. KREPUSKA, Gy. (1931), Kiegészítő adatok Budapest végénnyfaunájához. Ergänzende Angaben zur Protistenfauna von Budapest. *Ann. Mus. Nat. Hung.*, **27**, 20—37. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
15. LESENEYI, J., PAPP, A., TÖRÖK, P. (1954), A budapesti Dunaszakasz vizsgálata. Untersuchungen über den Abschnitt der Donau bei Budapest. *Hidrol. Közl.*, **34**, 414—423, 517—527. (Ungarisch.)
- 15a. PALIK P. (1949), Kernteilung bei *Hydrodictyon utriculatum* ROTH. *Index Herti Bot. Univ. Budapestinensis*, **7**, 150—173.
16. SZ. MUHITS, K. (1952), Vác város szennyvíztisztító telepének egy évi biológiai és kémiai vizsgálata. Einjährige biologische und chemische Untersuchung der Abwasserreinigungs-Anlage der Stadt Vác. *Hidrol. Közl.*, **32**, 244—253. (Ungarisch.)
17. SZ. MUHITS, K. (1955), A Duna szennyezettségének kímutatása biológiai vizsgálatok alapján, új grafikus ábrázolási módszer segítségével. Nachweis des Verunreinigungsgrades der Donau auf Grund biologischer Untersuchungen mittels eines neuen anschaulichen graphischen Verfahrens. *Hidrol. Közl.*, **35**, 335—342. (Ungarisch.)
18. TAMÁS, G. (1949), Adatok a budapesti Dunaszakasz algavegetációjának ismeretéhez. Contribution to the knowledge of Algae found in the River Danube at Budapest. *Hidrol. Közl.*, **29**, 206—211. (Ungarisch.)
19. UHERKOVICH, G. (1956), Adatok a *Scenedesmusok* magyarországi előfordulásának ismeretéhez. Beiträge über das Vorkommen der *Scenedesmus*-Arten in Ungarn. *A pécsi Pedagóg. Főisk. 1956. évi évk.*, 1—20. (Ungarisch.)
20. UHERKOVICH, G. (1957), Adatok a *Bangia atropurpurea* életmódjához. Beiträge zur Lebensweise der *Bangia atropurpurea*. *Bot. Közl.*, **47**, 51—54. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
21. WOYNAROVICH, E. (1944), A Bellyei tó, Kopácsi tó, valamint a Duna és a Dráva limnológiai viszonyainak keresztmetszete. Ein Querschnitt der limnologischen Verhältnisse der Bellyeer und Kopácer Seen, sowie der Donau und Drau. *Albertina*, **1**, 34—64. (Ungarisch.)

#### DATA REGARDING THE MICROFLORA AND MICROFAUNA IN THE ARMS OF THE DANUBE NEAR BAJA

An energetic research into the organisms living in the Danube, in which all countries situated along this river are represented, has been started by the "Arbeitsgemeinschaft Donauforschung des SIL." It is the Hungarian Danube Research Station which performs this work in Hungary. The authors of the present paper have worked up that planktonic material which one of them (KOL) collected in May and July, 1951, from the main current of the Danube at Baja and from its five branches there. Data regarding phytoplankton and zooplankton, as published in the paper, show therefore conditions as they were found nearly 10 years ago. Collections were always made in high water. Algal associations were found to be different in all branches of the river. Different was also the composition of the microfauna of which the rotifers have been worked up. Although hydrographically more or less connected, the water of each arm near Baja constitutes a separate biotope with characteristic biocoenoses. A number of species are, of course, common to all branches of the river.

The phytoplankton of the examined arms is dominated by Chlorophyceae to the extent of 51 to 80 per cent. A total of 97 species of vegetable microorganisms was found, 30 of which had been unknown in the Hungarian section of the Danube. The analysed biotopes contained many rare algae.

The zooplankton consisted mostly of rotifers in spring and especially in summer. The ratio of crustaceans reached 30 per cent in a single case only, and their percentage did not exceed 2 to 5 during summer. Side by side with euplanktonic species many tychoplanktonic species were encountered. It is only passively that the latter find access to the biotope of standing waters. Altogether 98 species, 17 varieties and 2 forms were registered. Predominant among them were Rotifera (8,5 per cent), about 10 species of which were encountered in the planktonic biocoenosis of the Danube arms at Baja. The plankton of these arms contains a great number of considerably variable species, a phenomenon presumably due to the special and constantly varying ecological conditions of the flowing water. Most of these species belong to the euplankton. Such a number of varieties has never been observed in bodies of standing

water, in the Lake Balaton for example. The phyto- and zooplankton of the Danube arms contain certain species in summer which occur in other standing waters of Hungary (Balaton) during winter only, and constitute there "cold stenothermal" forms. Of the examined species (varieties and forms), 13 were new in the Hungarian fauna.

## ДАННЫЕ К МИКРОФЛОРЕ И МИКРОФАУНЕ РУКАВОВ ДУНАЯ ОКОЛО Г. БАЙЯ

«Рабочий коллектив по исследованию Дуная СИЛ» (*Arbeitsgemeinschaft Donauforschung der SIL*) в котором участвуют все расположенные вдоль Дуная государства, усиленными темпами приступил к исследованию флоры и фауны Дуная. В Венгрии данную работу осуществляет Венгерская станция по исследованию Дуная. По этому поводу авторы разработали материал планктона, собранный др. Кол в мае и июле 1951 года из главного русла Дуная около г. Байя и из пяти побочных рукавов его. Таким образом сообщенные данные фитопланктона и зоопланктона показывают положение почти 10 лет тому назад. При проведении сборов уровень воды на Дунае был высокий. Ассоциации водорослей были различными в каждом рукаве Дуная. Структура микрофлоры также была различной, причем подробно разработались коловратки. Выяснилось, что рукава Дуная около г. Байя, несмотря на то, что в гидрографическом отношении их воды более или менее сообщаются, они все же представляют самостоятельные биотопы с индивидуальным биоценозом. Это, однако, не исключает того, что они имеют также многочисленные общие виды.

В фитопланктоне исследованных рукавов Дуная господствовали виды зеленых водорослей (51–80%). В общем были обнаружены растительные микроорганизмы, относящиеся к 97 видам. Среди них имеются 30 видов, которые до сих пор еще не были известны на венгерском участке Дуная. В исследованных биотопах жило также много редких видов водорослей.

Зоопланктон состоял весной, но главным образом летом в преобладающей части из коловраток. Ракообразные достигли 30%-го количества только в одном случае, но летом они имелись только в количестве 2–5%. Наряду с видами настоящего планктона наблюдалось много видов тихопланктона, попадающих в планктон биотопа стоячей воды только пассивным путем. В общем было определено наличие 98 видов, 17 разновидностей и 2 форм. Однако, из них в биоценозе планктона рукавов Дуная у г. Байя, главную роль играют своим массовым появлением около 10 видов коловраток (8,5%). В планктоне рукавов Дуная имеется много сильно варьирующих видов, что предположительно находится в связи со специальным, весьма разнообразными и постоянно меняющимися экологическими условиями речной воды. Эти виды относятся, главным образом, в круг видов настоящего планктона. Такое большое число видоизменений никогда не наблюдается напр. в озере Балатон. В фито- и зоопланктоне рукавов Дуная жили такие виды также летом, которые в других стоячих водах Венгрии (Балатон) встречаются только зимой, значит, которые там являются холодностенотермными формами. Для фауны Венгрии 13 видов (разновидностей и форм) оказались новыми.

ERZSÉBET KOL, Budapest XIV. Vajdahunyadvár, Ungarn.

LAJOS VARGA, Sopron, Bajcsy-Zsilinszky u. 3. Ungarn.



# UNTERSUCHUNG DER PHOSPHOMONOESTERASEN IN DEN ZENTRALEN NERVENGANGLIEN DER WEINBERGSCHNECKE (*HELIX POMATIA*)

Gy. DOMJÁN und E. MINKER

CHEMISCHES UND BIOCHEMISCHES (VORSTAND: A. KRÁMLI) SOWIE PHARMAKOLOGISCHES INSTITUT  
(VORSTAND: N. JANCSSÓ) DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄT, SZEGED

(Eingegangen am 20. Februar, 1960)

## Zusammenfassung

Es wurde die Aktivität der Phosphomonoesterasen in den zentralen Nervenganglien der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) unter verschiedenen experimentellen Bedingungen *in vitro* untersucht und die Gewebslokalisation dieser Fermente bestimmt.

Mit biochemischen Methoden konnte nachgewiesen werden, daß das aus den zentralen Nervenganglien der Weinbergschnecke hergestellte Homogenat ausgeprägte alkalische bzw. saure Phosphataseaktivität zeigt. Von diesen Fermenten hat sich bei 20 und 37° C die alkalische Phosphatase aktiver erwiesen. Die Aktivität der Fermente hat sich *in vitro* nicht verändert, wenn die Tiere 28 Tage bei einer Temperatur von +4° C gehalten wurden. Unverändert blieb die Aktivität dieser Fermente auch, als die Tiere 25 Tage lang in eine wasser- und nahrungslose Umgebung versetzt wurden.

Es wurde untersucht, wie sich die *in vitro* Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase in den Nervenganglien frischer Schnecken bei 10, 20, 30, 40 und 50° C gestaltet. Nach den Ergebnissen erhöht sich die Aktivität der alkalischen Phosphatase mit der Steigerung der Temperatur stärker als die der sauren Phosphatase. Die aus den bei verschiedenen Temperaturen gemessenen Aktivitätswerten errechnete Aktivierungsenergie der alkalischen und sauren Phosphatase ist annähernd gleichwertig.

Wie die histochemischen Untersuchungen ergaben, ist die saure Phosphatase im Zytoplasma der Ganglienzellen, die alkalische Phosphatase in der interzellulären Substanz der Ganglien anwesend.

## Einleitung

Die Phosphomonoesterasen stellen sowohl in der Tier- wie in der Pflanzenwelt wichtige und sehr verbreitete Fermente dar.

In den letzten Jahren haben wir die Veränderungen der *in vitro* bestimmten Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase mit dem mehr oder weniger bekannten Grad des funktionellen und morphologischen Entwicklungszustandes der verschiedenen Gehirnteile in der Phylogenie der Wirbeltiere verglichen [1]. Im Rahmen dieser Untersuchungen studierten wir die Übereinstimmungen und Verschiedenheiten zwischen den einzelnen Klassen und suchten Zusammenhänge zwischen der Lebensform der untersuchten Tiere und der Phosphataseaktivität der wichtigsten Gehirnzonen zu finden. Ferner bestimmten wir die Aktivität der Phosphomonoesterasen bei verschiedenen Temperaturen, und aus den gewonnenen Angaben nahmen wir reaktionskinetische Berechnungen vor [2]. Die Ergebnisse dieser Arbeiten veranlaßten uns, die Untersuchungen auch auf das Nervensystem der wirbellosen Tiere auszudehnen.

Unter unseren Verhältnissen erschien uns die Weinbergschnecke als das geeignetste Untersuchungsobjekt. Bei diesem Tier lassen sich — im Hinblick auf seine natürlichen Lebensbedingungen — die Wirkungen der längeren Abkühlung, des Hungerns und der Austrocknung auf die *in vitro* Aktivität dieser Fermente gut untersuchen.

Wir bestimmten die Aktivitäten der alkalischen und sauren Phosphatase biochemisch und waren bestrebt, die Lokalisation dieser Fermente in den zentralen Nervenganglien der Weinbergschnecke mit histochemischen Methoden zu ermitteln.

Das Nervensystem von *Helix pomatia* ist ein stark verändertes Ganglien-nervensystem. Bei den Pulmonata konzentrierten sich die bei den Gastropoda im allgemeinen vorzufindenden Nervenganglien auf den Anfangsabschnitt des Darmkanals, um den muskulären Schlund, wodurch ein geschlossener Schlundnervenring entstand. Dieser Nervenring enthält die über dem Schlund anwesenden Gehirnganglien sowie die unter dem muskulösen Schlund befindlichen parietalen, viszeralen, pleuralen und pedalen Ganglien. Die um den Schlund liegenden Ganglien kann man als zentrale Ganglien bzw. im Gegensatz zum peripheren Abschnitt des Nervensystems auch als Zentral-nervensystem bezeichnen, da sich das periphere Nervensystem in Form kleinerer und größerer Nervenstämme und mikroskopischer Ganglien in der Wand des Darmkanals, in der Beinmuskulatur usw. befindet.

Bei den Schnecken mit primitivem Nervensystem liegen die einzelnen Ganglien mitunter in größerer Entfernung voneinander, und die Verbindung zwischen den Ganglien wird durch die Konnektiven gewährleistet. Infolge der Konzentration liegen die unter dem Schlund befindlichen Ganglien bei *Helix pomatia* sehr nahe nebeneinander und verschmelzen makroskopisch geradezu miteinander, doch sind die Grenzen der einzelnen Ganglien und die Fragmente der Konnektiven im mikroskopischen Bild gewöhnlich zu erkennen. Die über und unter dem Schlund liegenden zentralen Ganglien sind durch gut entwickelte, auch makroskopisch erkennbare Konnektiven verbunden, die nicht nur aus Leitungselementen bestehen, sondern auch Nervenzellen enthalten und daher eigentlich als Markstamm anzusehen sind.

Die mikroskopische Struktur der Nervenganglien von *Helix pomatia* lässt sich folgendermaßen charakterisieren: In den einzelnen Ganglien sind sehr verschieden große Ganglienzellen anzutreffen, die sich — wie bei den Wirbellosen im allgemeinen — am peripheren Teil der Ganglien rindenartig lagern. Die Ganglienzellen sind überwiegend unipolar, ihr Kern ist ungewöhnlich groß und mit granulösem Chromatin gefüllt. Die Nervenzellen entsenden ihre Fortsätze in den Zentralabschnitt der Ganglien, der ausschließlich aus Massen von Nervenfasern besteht. Diese Substanz der Ganglien wird in der Literatur auf Grund der ersten Beschreibungen Neuropylema oder Punktsubstanz genannt, doch erscheint uns diese Benennung unrichtig und die

Bezeichnung innere Fasersubstanz oder Marksubstanz viel zutreffender. In den Nervenganglien befinden sich sowohl zwischen den Ganglienzellen als auch zwischen den Nervenfasern Gliazellen bzw. durch gliaartige Isolierungszellen gebildetes Plasmodium.

Die zentralen Nervenganglien erhalten ihre Hämolympfversorgung aus der Arteria cephalica. Die Gefäße verlaufen in Form kleiner Arteriolen und Kapillaren in der die Ganglien außen umgebenden und auch in ihr Inneres eindringenden Bindegewebssubstanz, die sich von den eigentlichen Nervenelementen präparativ nicht trennen läßt.

### Biochemische Methode

Die biochemischen Bestimmungen der sauren Phosphatase wurden nach dem unserseits etwas modifizierten Verfahren von FLEXNER und FLEXNER [4] vorgenommen, wobei 0,5%iges  $\beta$ -Na-glyzerophosphat als Substrat im Puffer von pH 5 anwesend war.

Nach dem Herauspräparieren wurden die Nervenganglien der Schnecken bei niedriger Temperatur in der Reibschale homogenisiert. Das Homogenat enthielt je ml 20 mg Feuchtsubstanz.

Die alkalische Phosphatase wurde im wesentlichen ebenso bestimmt wie die saure; Na-Glyzerophosphat lösten wir in Veronalpuffer pH 9 gleichfalls in einer der 0,5%igen Konzentration entsprechenden Menge.

Den von den Fermenten aus dem Substrat abgespaltenen Phosphor bestimmten wir nach FISKE und SUBBAROW [3].

### Biochemische Ergebnisse

Anfangs bestimmten wir die Aktivität der beiden Phosphatasen in den Nervenganglien frisch gesammelter Schnecken. Diese Versuche wurden in zwei Serien durchgeführt. In einer erfolgte die einstündige Inkubation der Proben bei 37° C, in der anderen — mit Rücksicht auf die natürliche Temperatur der Schnecken — bei 20° C. Die Resultate dieser Versuche veranschaulicht Tabelle 1.

Bei den einzelnen Versuchen wurden 5—6 Parallelproben bestimmt und ihre Mittelwerte in die Tabelle aufgenommen. Die Aktivitäten sind in gamma Phosphor ausgedrückt und beziehen sich auf 100 mg Feuchtsubstanz. Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist die Aktivität der alkalischen Phosphatase bei beiden Temperaturen höher als die der sauren Phosphatase.

Im folgenden untersuchten wir, welche Wirkung der Umstand auf die Aktivität der Fermente ausübt, daß die Schnecken längere Zeit der Wirkung niedrigerer Temperatur ausgesetzt oder längere Zeit in wasser- und nahrungsloser Umgebung gehalten werden.

Zu diesem Zweck wurden 60—80 Schnecken in den Eisschrank gelegt, dessen konstante Temperatur +4° C war. Bei dieser niedrigen Temperatur zogen sich die Schnecken in ihr Haus zurück und bewegten sich nicht mehr. Nach 28tägiger »Hibernation« legten wir sie in Wasser von Zimmertempera-

Tabelle 1

Versuch Nr.	Alkalische Phosphatase $\gamma$ P/100 mg Fs.	Saure Phosphatase $\gamma$ P/100 mg Fs.
37° C		
1.	223	76
2.	273	120
3.	200	76
4.	266	76
5.	276	96
6.	270	96
7.	300	—
Durchschnitt	258	90
20° C		
1.	90	65
2.	120	52
3.	132	35
4.	136	—
5.	133	—
Durchschnitt	122	50

tur. Etwa 90% der Tiere krochen aus dem Haus und zeigten die normalen Lebenserscheinungen. Innerhalb von 30 Minuten nach der Herausnahme aus dem Eisschrank wurden die Nervenganglien der Schnecken herauspräpariert und in dem aus diesen bereiteten Homogenat die Aktivitäten der Phosphatasen bestimmt. Diese Versuche ergaben, daß nach vierwöchiger Aufbewahrung bei niedriger Temperatur (+4° C) weder die Aktivitäten der sauren noch die der alkalischen Phosphatase gegenüber denen der frischen Schnecken wesentlich nicht verändert waren.

In einer anderen Versuchsreihe wurden die Tiere bei Zimmertemperatur in ein leeres Gefäß gelegt. Um sich gegen die Austrocknung zu schützen, zogen sich die Schnecken zurück. Nach 10 bzw. 25 Tagen legten wir sie ins Wasser, worauf die meisten Tiere hervorkrochen. Auch bei diesen in wasser- und nahrungsloser Umgebung gehaltenen Schnecken ist in der Aktivität der Fermente keine wesentliche Veränderung eingetreten.

In der zweiten Hauptgruppe der Versuche untersuchten wir, wie sich die Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase in den Ganglien frischer Schnecken *in vitro* verändert, wenn die Temperatur von 10 auf 50° C erhöht wird. Die Proben wurden 60 Minuten bei 10, 20, 30, 40 und 50° C inkubiert. Die Resultate dieser Versuche zeigt Abb. 1.

Nach den Angaben des Diagramms erhöht sich mit der Temperatursteigerung die Aktivität der alkalischen Phosphatase in stärkerem Maße und weiter als die der sauren Phosphatase. Die Aktivität der sauren Phosphatase zeigt

bei einer höheren Temperatur als 30° C eine schwächere Steigung als bis 30°, und ungefähr bei 40° C beginnt bereits die Denaturation des Ferments, die sich bei weiterer Temperaturerhöhung in sinkender Aktivität manifestiert. Im Zentralnervensystem der Wirbeltiere ist unter den beiden Fermenten die alkalische Phosphatase einer höheren Temperatur als 35° gegenüber empfindlicher.

Nach Feststellung der bei verschiedenen Temperaturen bestimmten Aktivitäten der alkalischen und sauren Phosphatase errechneten wir die Aktivierungsenergiwerte für diejenigen Temperaturabschnitte, von denen wir annahmen, daß die Fermente in ihnen ihre für diese Temperatur charakteristische Aktivität bereits ausgeübt haben, ohne denaturiert zu sein. Bei der Errech-

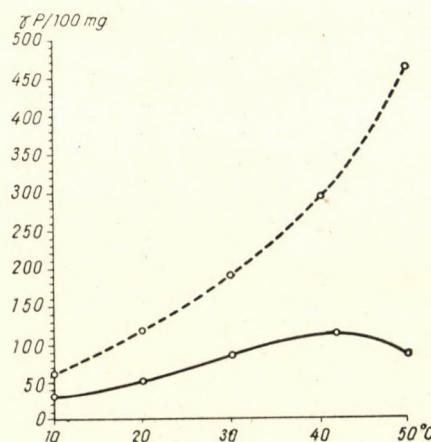


Abb. 1. Die Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatase im Nervengewebe der Weinbergschnecke in Abhängigkeit von der Temperatur.

○---○ alkalische Phosphatase; ○—○ saure Phosphatase

nung der Aktivierungsenergien wandten wir die bekannte ARRHENIUSSCHE Gleichung an:

$$\mu = (\ln k_1 - \ln k_2) R \frac{T_1 T_2}{T_2 - T_1},$$

wo  $\mu$  der Aktivierungsenergie,  $k_1$  und  $k_2$  der Fermentaktivität bei den absoluten Temperaturen  $T_1$  und  $T_2$  und  $R$  der Universal-Gaskonstante entsprechen. Die Werte der Aktivierungsenergie für die einzelnen Temperaturabschnitte sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Nach den Tabellenangaben ist die Aktivierungsenergie der alkalischen Phosphatase im Temperaturintervall von 10—50° C im wesentlichen dieselbe ( $\mu = 9048$  g-kal) wie die der sauren Phosphatase im Temperaturintervall zwischen 10—30° C ( $\mu = 8829$  g-kal). Es sei erwähnt, daß die Aktivierungsenergie

Tabelle 2

Alkalische Phosphatase		Saure Phosphatase	
Temperaturintervall	in $\mu\text{g}\text{-kal}$	Temperaturintervall	in $\mu\text{g}\text{-kal}$
10—20	10 648	10—20	8 730
20—30	8 609	20—30	8 929
30—40	8 145		
40—50	8 792		
Durchschnitt bei 10—50° C	9 048	Durchschnitt bei 10—30° C	8 829

der alkalischen Phosphatase im Hirngewebe der Wirbeltiere niedriger ist als die der sauren Phosphatase.

### Histochemische Ergebnisse

Zum histologischen Nachweis der alkalischen und sauren Phosphatase verwendeten wir die von GÖMÖRI und TAKAMATSU bzw. von GÖMÖRI angegebenen Methoden [5].

Der den lebenden Tieren entnommene Schlundnervenring wurde ohne Fixierung bzw. nach Formalinfixierung während  $\frac{1}{2}$ , 1, 3, 6 bzw. 12 Stunden gefroren zerschnitten. Die fixierten Stoffe wurden vor der Schnittherstellung 5 Minuten in Wasser gewaschen. Die Schnitte applizierten wir nicht auf Objektträger, sondern legten sie direkt in die Inkubationslösung. Mit Rücksicht darauf, daß zur Aufarbeitung je einer Schnittserie die Ganglien mehrerer Schnecken herausgenommen werden mußten, hielten wir die ohne Fixierung aufgearbeiteten Materialien bis zur Schnittherstellung in Hämolymphe. Die Aufarbeitung der unfixierten Materialien stellt eine außerordentlich schwierige und umständliche Manipulation dar. Die fixierten Materialien lassen sich viel besser behandeln, weshalb der größte Teil unserer Schnitte aus Materialien stammt, die vor dem Schnitt kürzere oder längere Zeit fixiert wurden. Wir rechneten von vornherein damit, daß sich durch die Fixierung gewisse Aktivitätsverluste ergeben, und waren bestrebt, uns über ihr Ausmaß durch Versuche *in vitro* zu überzeugen. In einem Teil des frisch entnommenen Untersuchungsmaterials wurde die Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatasen sogleich nach der Herausnahme bestimmt. Das übrige Material legten wir in Formalin, dann wurden die 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden fixierten Materialien nach 5 Minuten Waschen mit Wasser homogenisiert, worauf wir die Aktivität der Phosphatasen bestimmten. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen enthält Tabelle 3.

Tabelle 3

Dauer der Formalinfixierung in Stunden	$\gamma\text{P}/100 \text{ mg Feuchtsubstanz}$	
	Alkalische Phosphatase	Saure Phosphatase
0	170	110
1	140	80
3	80	40
6	80	30
12	80	30
24	90	10

Nach einstündiger Fixierung ist demnach mit einem 20—30%igen Aktivitätsverlust zu rechnen. Nach dreistündiger Formalinfixierung nimmt die Aktivität der Präparate stark ab und bleibt sodann ungefähr auf dem gleichen Niveau. Von der Temperatur der Fixierflüssig-

keit wird die Aktivität bzw. der Erfolg der Gewebslokalisierung nicht beeinflußt, ja die Aktivität der untersuchten Fermente veränderte sich selbst dann nicht beträchtlich, wenn wir das frisch zubereitete Homogenat bei 37° C längere Zeit stehen ließen.

Die Inkubation der einzelnen Schnittserien erfolgte bei 37° C, und die Schnitte wurden in Intervallen von 10 Minuten kontinuierlich entwickelt. Nach unseren Erfahrungen ist die einstündige Inkubation als optimal zu betrachten, weil eine zufriedenstellende Gewebslokalisierung zutage tritt.

Die in die Inkubationslösung gelegten Schnitte wurden abwechselnd mit Kontrollschnitten unter Benutzung eines Glassstäbchens in die einzelnen Medien überführt. Auf diese Weise vermochten wir in anderthalb Stunden eine größere Menge Schnitte aufzuarbeiten und die Untersuchungen oft zu wiederholen. Über die Löslichkeit des bei den Reaktionen entstandenen Niederschlages wollen wir lediglich bemerken, daß sich PbS aus den in destilliertem Wasser befindlichen Schnitten binnen 12 Stunden vollständig herauslöste.



Abb. 2. Subintestinales Ganglion, saure Phosphatasreaktion. Übersichtsbild. Die Ganglionzellen sind aktiv, die interzelluläre Substanz und die innere Fasernsubstanz inaktiv. Einstündige Inkubation

Die saure Phosphataseaktivität tritt im Zytoplasma der Ganglionzellen in Erscheinung (Abb. 2 und 3). Die Reaktion ist spezifisch und bereits etwa 30 Minuten nach der Inkubation zu beobachten. Der Ort der Lokalisation wird anfangs durch eine grob verteilte Bleisulfid-Granulation angezeigt, die bei Verlängerung der Inkubationsdauer immer intensiver erscheint. Nach zweistündiger Inkubation ist der Niederschlag schon ganz kompakt, und die Zellen sind stark braun gefärbt. Zu dem Zeitpunkt, wo der homogene Bleisulfidniederschlag in den Ganglionzellen erscheint, muß bereits mit Enzymdiffusion gerechnet werden. Jetzt zeigen außer den Ganglionzellen auch die innere Fasernsubstanz und das umgebende Bindegewebe gelbliche Färbung, obgleich zwischen diesen Gewebelementen eine erkennbare Differenz in der Farbintensität besteht. Anfangs zogen wir die Möglichkeit in Betracht, daß es sich bei der granulösen Bleisulfidausscheidung um ein Kunstprodukt handelt, doch mußten wir diesen Gedanken verwerfen, weil die oft und zu verschiedenen Jahreszeiten (um die Möglichkeit der jahreszeitlichen Schwankungen auszu-

schließen, im Frühjahr, Sommer und Herbst) vorschriftsmäßig wiederholte Reaktion immer dasselbe Bild ergab: Einen anfangs feineren, nach Verlängerung der Inkubationsdauer allmählich kompakter werdenden Niederschlag, und diese Niederschlagsbildung trat ausschließlich in den Ganglienzellen auf. Zu gleicher Zeit arbeiteten wir auch Grenzstrangganglien von Katzen auf, und in denselben Reagenzien trat im Wirbeltiermaterial ein ganz homogener Niederschlag zutage. Im Zusammenhang mit der sauren Phosphatasase sei bemerkt, daß nicht jede Ganglienzelle gleich starke Aktivität zeigt,

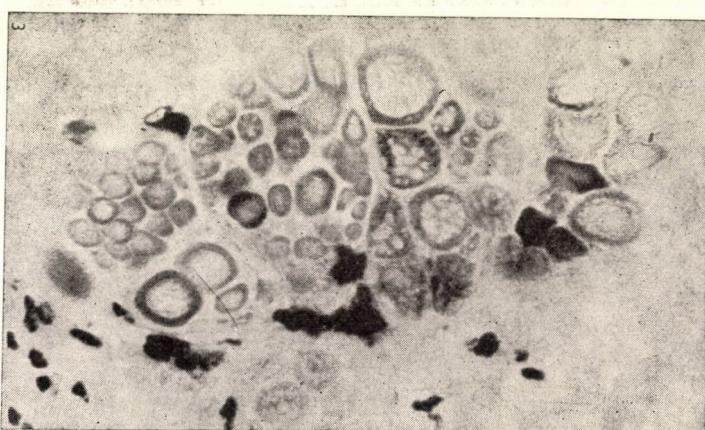


Abb. 3. Subintestinales Ganglion, saure Phosphatasereaktion. 30 Minuten Inkubation

sondern in einzelnen Ganglienzellen eine stärkere Bleisulfidausscheidung beobachtet werden kann als in den anderen.

In der Initialphase der Inkubation ist im Kern der Ganglienzellen keine oder nur ganz schwache Aktivität wahrzunehmen; zu gleicher Zeit tritt im Inneren des Kerns schwach ein gelbliches inneres Gitter hervor, das besonders bei den Riesenzellen sichtbar ist, während bei den kleinen Zellen von Glomerulus-Typ nach etwa einstündiger Inkubation nur der Kern Aktivität zeigt, während die Umrisse des Zellplasmas kaum wahrgenommen werden können oder sich überhaupt nicht abzeichnen. Das ist durchaus verständlich, da ja das Plasma dieser Zellen, die das Procerebrum bilden, auch unter normalen Verhältnissen mit den üblichen und speziellen Färbungs- oder Imprägnationsverfahren kaum nachgewiesen werden kann.

Saure Phosphatasaktivität stellten wir auch in den Nervenzellen fest, die im zerebroviszeralen Konnektivum verstreute bzw. kleinere Haufen bilden.

Saure Phosphatasaktivität weisen demnach die Ganglienzellen auf, während die innere Fasernsubstanz der Ganglien und die interzelluläre Substanz inaktiv sind. Selbst makroskopisch ist zu sehen, daß nur gewisse Zonen in den

Schnitten braun werden und die braunen Zonen einen stecknadelkopfgroßen hellen Raum umschließen.

Die alkalische Phosphatasereaktion tritt in der interzellulären Substanz zwischen den Ganglienzellen, in der inneren Fasernsubstanz der Ganglien sowie im Perineurium der größeren Nervenstämmen in Erscheinung (Abb. 4). Auch in diesem Fall ergibt die einstündige Inkubation das am besten entsprechende Bild. Das Plasma der Ganglienzellen erscheint in diesen mikroskopischen Bildern hell (aktiv) und stark vakuolisiert.

In sämtlichen Schnitten haben wir an den einzelnen Gangliengrenzen und im äußeren Bindegewebe aktive Flecke beobachtet, bei denen es sich um



Abb. 4. Subintestinales Ganglion, alkalische Phosphatasereaktion. Die interzelluläre Substanz ist aktiv. Einstündige Inkubation

kleinere Zellhaufen handelt, die aus den in den Fragmenten des zentralen Nervenganglien versorgenden Gefäßnetzes sichtbaren Formelementen der Hämolymphe bestehen.

Bei der Bewertung der Lokalisation verwendeten wir Kontrollschnitte, die in substratfreier Lösung inkubiert worden waren. Auf Grund der Kontrollschnitte konnte festgestellt werden, daß die im Gefäßnetz der Nervenganglien erscheinende Phosphatasereaktion nicht spezifisch ist.

### Besprechung

Aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen an den zentralen Nervenganglien der Weinbergschnecke wollen wir einstweilen keine weiteren Schlußfolgerungen ziehen, da die hier besprochenen Versuche lediglich als ein erster

Schritt zu betrachten sind. Aller Wahrscheinlichkeit nach werden jedoch, wenn wir die Untersuchungen auf andere wirbellose Arten, weitere Fermente und grundlegende biochemische Prozesse ausdehnen, Angaben über die Phosphomonoesterasen zu gewinnen sein, die sich bei der Deutung der im Nervensystem der wirbellosen Tiere vor sich gehenden Stoffwechselprozesse nützlich erweisen.

#### LITERATUR

- Домян, Д. (1959), Фосфомоноэстеразы мозга в филогенезе позвоночных. *Докл. Акад. Наук. СССР*, **126**, 442—445.
- Домян, Д. (1959), Влияние температуры на активность кислой и щелочной фосфатаз мозга позвоночных *in vitro*. *Докл. Акад. Наук. СССР*, **126**, 675—677.
- FISKE, C. H., SUBBAROW, Y. (1925), The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375—400.
- FLEXNER, L. B., FLEXNER, I. B. (1948), Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis. VI. Adenosintriphosphatase and acid phosphatase activities in the developing cerebral cortex and liver of the fetal guinea pig. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **31**, 311.
- KISZELY, Gy., BARKA, T. (1958), Gyakorlati mikrotechnika és hisztokémia. Mikrotechnik und Histochemie. Medicina, Budapest. (Nur ungarisch.)

#### INVESTIGATION OF PHOSPHOMONOESTERASES IN THE CENTRAL GANGLIA OF SNAILS (*HELIX POMATIA*)

The paper describes in-vitro experiments made with a view to determining the activity of phosphomonoesterases in the central ganglia of the snail (*Helix pomatia*) under different experimental conditions, furthermore, experiments which had the object to ascertain the site of these ferments in the tissues.

Biochemical analysis proved the homogenized central ganglia of edible snails to reveal marked alkaline or acid phosphatase activity. Heated to a temperature of 20 and 37° C, it was the alkaline phosphatase which seemed to be more active. No change in the in-vitro activity of these enzymes was observed when the animals were kept at a temperature of 4° C for 28 days. Nor was any change observed when the animals were deprived of water and food during 25 days.

A group of experiments had the purpose to observe the in-vitro activity of both alkaline and acid phosphatases in the ganglia of edible snails at temperatures of 10, 20, 30, 40 and 50° C. It was found that the activity of the alkaline enzyme increased with rising temperature longer than that of the acid phosphatase. The energy of activation, derived from the values of activity at different temperatures, seemed to be approximately equal in respect of both enzymes.

Histochemical examinations lead to the conclusion that acid phosphatase is situated in the cytoplasm of the ganglion cells, while alkaline phosphatase is seated in the intercellular substance of the ganglia.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ФОСФОМОНОЭСТЕРАЗ В ЦЕНТРАЛЬНЫХ ГАНГЛИОНАХ ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ (*HELIX POMATIA*)

Авторы исследовали *in vitro* активность фосфомоноэтераз в центральных ганглионах виноградных улиток (*Helix pomatia*) при разных опытных условиях а также определили локализацию этих же ферментов гистохимическим путём.

Биохимическим методом было показано, что гомогенизаты, изготовленные из тканей центральных ганглионов виноградных улиток проявляют выраженную кислую и щелочную фосфатазную активность.

Из этих двух ферментов щелочная фосфатаза оказалась более активной как при  $37^{\circ}$ , так и при  $20^{\circ}$  температуры. Не изменилась активность кислой и щёлочной фосфатаз, если улиток, предварительно перед опытом, держали на холода в холодильнике при  $+4^{\circ}$  температуры в течение 28 дней.

Также не изменилась активность этих исследованных ферментов, если животные держались в условиях без питания и воды при комнатной температуре в течение 25 дней.

В другой серии опытов авторы исследовали изменение активности кислой и щелочной фосфатаз в центральных ганглионах у свежих, только что собранных улиток при  $10^{\circ}$ ,  $20^{\circ}$ ,  $30^{\circ}$ ,  $40^{\circ}$  и  $50^{\circ}$  температуры. Результаты этих опытов показали, что активность щелочной фосфатазы в большей мере поднимается с повышением температуры, чем активность кислой фосфатазы. Кислая фосфатаза выше  $30-35^{\circ}$  уже постепенно теряет свою активность в то время как щелочная фосфатаза даже при  $50^{\circ}$  температуры не достигает максимума своей активности.

Были высчитаны величины энергии активации для кислой и щелочной фосфатаз на основании полученных активностей при разных температурах. Оказалось, что численные величины энергии активации у обоих ферментов составляют около 9,000 грам калорий.

По результатам гистологических опытов кислая фосфатаза локализуется главным образом в цитоплазме ганглионовых клеток, а щелочная фосфатаза в межклеточном веществе ганглионов, т. е. экстрацеллюлярно.

GYULA DOMJÁN, Beloianisz-tér 8. Szeged, Ungarn.

EMIL MINKER, Beloianisz-tér 12. Szeged, Ungarn.



# DIE VERÄNDERUNGEN DER BLUTEIWEISSFRAKTIONEN MIT DEM FORTSCHREITENDEN ALTER DER PFERDE

F. MUNKÁCSI

TIERGENETISCHE FORSCHUNGSGRUPPE DER UNGARISCHEN AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN,  
GÖDÖLLŐ (VORSTAND: GY. FÁBIÁN)

(Eingegangen am 5. März, 1960)

## Zusammenfassung

Die Gesamteiweißmenge, die papierelektrophoretisch getrennten Eiweißfraktionen und die Fibrinogenmenge im Plasma von Warmblutpferden derselben Zucht aus zwei Gestüten wurden untersucht, um den Einfluß des Alters zu ermitteln. Aus den Ergebnissen der Thymol- und Kadmiumprobe wurde versucht, Anhaltspunkte für das Erscheinen der pathologischen Eiweißfraktionen zu gewinnen. Das Alter der untersuchten Pferde erstreckte sich vom Saugfohlenalter bis zum 20. Lebensjahr.

Der Gesamteiweißgehalt nimmt mit dem Alter ständig zu. Bis zum Alter von  $1\frac{1}{2}$  Jahren wird die Eiweißvermehrung durch die Zunahme der beta-Globulinfraktion, in den weiteren Stadien der Ontogenese beinahe ausschließlich durch die Erhöhung der absoluten gamma-Menge hervorgerufen. Die vom Alter abhängige Veränderung der Albumin- und alpha-Globulinmenge ist nicht beträchtlich und nicht charakteristisch. Der Fibrinogengehalt im Plasma ist bis zum Alter von  $1\frac{1}{2}$  Jahren nahezu auf die Hälfte gesunken und anschließend wieder gestiegen. Aus den Ergebnissen der Thymol- und Kadmiumprobe konnte nicht geschlossen werden, daß die mit dem Altern zusammenhängende Erhöhung der Serumeiweißkonzentrationen auf der Anwesenheit umfangreicher pathologischer Fraktionen beruhen würde. Aus den Resultaten ergibt sich ferner, daß die aus den Serumeiweißfraktionen gezogenen Folgerungen zu falscher Diagnose führen können, wenn man das Alter unberücksichtigt läßt. Es scheint weiterhin, daß sich mit dem Altern Fraktionen vermehren, denen in der Abwehr des Organismus eine lebenswichtige Rolle zufällt.

## Einleitung

Da die quantitative und qualitative Veränderung der Serumeiweiße mit zahlreichen im Organismus vor sich gehenden Zustandsveränderungen einhergeht, werden die sich daraus ergebenden Resultate in der Diagnostik ausgetragen und verwertet. Die eingehende Untersuchung des Eiweißspektrums wurde durch die Vervollkommnung und Vereinfachung der Methoden ermöglicht. Zuerst mußten die physiologischen Werte festgestellt werden. Mit Rücksicht auf den Aufbau und Stoffwechsel des Organismus müssen jedoch mit den Altersveränderungen jeweils andere Werte als physiologisch angesehen werden. Bei Pferden ist dieser Faktor anlässlich der Ermittlung der Durchschnittswerte bisher kaum berücksichtigt worden. Aus diesem Grunde wurde die Gestaltung der Serumeiweißfraktionen bei den im Gestüt gehaltenen warmblütigen Pferden gleichen Geschlechts, aber verschiedenen Alters vom Saugalter bis zum 20—22. Jahr untersucht. Aus den Ergebnissen der Thymol- und Kadmiumprobe wurde auf die pathologischen Fraktionen geschlossen.

### Versuchsanordnung

Eine derartige Untersuchung wäre dann ganz präzise, wenn man sie an einer größeren Zahl derselben Tiere von der Geburt bis zum natürlichen Tode unter sonst identischen Bedingungen durchführen würde. Bei den Haussäugetieren würde sich aber eine solche Untersuchung auf eine allzu lange Zeit erstrecken. Vom biologischen Gesichtspunkt eignet sich zur Verallgemeinerung die an einer Art vorgenommene Untersuchung, bei der die Werte durch die mit der Ausnutzung einhergehenden Stoffwechselbelastungen (Milchproduktion, beschleunigte Fleischbildung, verschiedene Arbeitsleistungen) nicht verändert werden, weil diese mit biologischen Methoden nicht ausgeschaltet werden können. Aus diesem Grunde wählten wir die Versuchstiere aus der Warmblutzucht in Mezőhegyes und Bábola, wo die Tiere unter den gleichen Stall-, Fütterungs-, Pflege- und sonstigen Bedingungen in einem Gestüt leben. Insgesamt wurde das Blut von 42 Pferden untersucht. Jede Altersgruppe umfaßte 6 Pferde, von denen je 3 aus den beiden Gestüten stammten. Die einzelnen Altersgruppen bestanden aus Saug-,  $\frac{1}{2}$ -, 1  $\frac{1}{2}$ -, 3-, 7-, 14- und 20jährigen Pferden. Sämtliche Tiere waren weiblichen Geschlechts, sie leisteten keine Arbeit, und ihr Gesundheitszustand war einwandfrei. Das Blut wurde aus der Vena jugularis entnommen. Die Blutentnahmen erfolgten in den Monaten November und Dezember. Bei jeder Untersuchung wurden die gemeinsam zu behandelnden Blutproben so ausgewählt, daß die Blutproben der Pferde aus verschiedenen Altersgruppen im gleichen Verhältnis in jeder Untersuchungsgruppe vorkamen.

### Methoden

Den Gesamteiweißgehalt im Serum bestimmten wir mit dem ABBESCHEN Zeiss-Refraktometer, durch das wir Wasser von 20° C aus dem Ultrathermostaten strömen ließen.

Die Fraktionierung der Serumweiße wurde an einer Apparatur vorgenommen, wo die konstante Temperatur durch unten und oben erfolgte Kühlung zwischen doppelwandigen Platten gewährleistet war. Mit einer äußeren und inneren Pufferwanne suchten wir zu verhindern, daß die sog. Elektrodenprozesse bei der Anode die Säuerung und bei der Katode die Alkalisierung des Puffers hervorrufen. Auf Whatman-Filtrerpapier Nr. 1 wurde 3 cm breit 0,01 ml Serum aufgetragen und aus dem Gleichrichter 1,5 mA Stromstärke mit 200 V Spannung auf die Streifen geschickt. Die Wanderungsdauer betrug 16 Stunden im pH 8,6 Veronal-Natrium-Natriumazetat-Salzsäure-Puffer. Die Ionenstärke war 0,1. Bei Spannungssenkung von 7 V/cm betrug die Wanderungsgeschwindigkeit der Albumine 8,7 mm je Stunde. Die beiden äußersten Fraktionen entfernten sich etwa 7,5 cm voneinander. Die Färbung erfolgte mit saurem Fuchsin. Die quantitative Bestimmung geschah nach der Auslösungsmethode, die Eiweißkonzentration bestimmten wir mit dem Pulfrichschen Photometer.

Der Fibrinogengehalt wurde nach der GERENDÁSSCHEN Methode [6] festgestellt, bei der das im Plasma anwesende Fibrinogen mit Thrombin zu Fibrin umgestaltet, das Koagulum in absolutem Alkohol ausgedrückt, in Äther dehydriert, bei 105° C bis zum Konstantgewicht getrocknet und auf der analytischen Waage gewogen wird. Wenn man den aus 1 ml Plasma gewonnenen Wert mit 100 multipliziert, so erhält man den Fibrinogenwert in mg%.

Die Thymol- und Kadmiumproben wurden auf übliche Weise durchgeführt.

### Ergebnisse

#### *Die Veränderung der Serumgesamteiweißmenge*

Bei den Untersuchungen von CHOPARD [3] betrug die Gesamteiweißmenge im Serum der Pferde durchschnittlich 7 g%, während die von ihm zitierten Autoren Werte von 7,23, 7,12 und 7,34 g% angaben. KUTHY und JUHÁSZ [8] erwähnen bei neugeborenen Fohlen lediglich 3,7 g% Eiweiß, wovon  $\frac{2}{3}$  aus Albumin bestehen. TÓTH [12] ermittelte bei den Neugeborenen von 5 Haus-

tierarten niedrigere Gesamteiweißmengen als bei den vollentwickelten Tieren derselben Arten. LARSON und TOUCHBERRY [9] stellten im Serum von Rindern etwa bis zum 7. Jahr die kontinuierliche und beträchtliche Vermehrung des Gesamteiweißgehalts fest.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen sind in Tabelle 1 und Abb. 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

Saugfohlen	Alter (Jahre)					
	½	1½	3	7	14	20—22
Gesamteiweiß g%						
5,53	8,29	7,87	8,83	8,94	9,94	9,53
6,00	7,70	7,76	8,76	9,18	9,72	8,70
6,53	7,00	7,87	8,70	9,53	9,29	8,70
6,82	8,30	7,42	8,65	8,12	7,76	7,70
7,00	7,06	8,54	7,65	8,12	7,54	7,76
7,48	7,12	7,82	6,82	8,42	7,82	7,76
$\bar{x} = 6,56$	7,58	7,87	8,23	8,68	8,67	8,19

$$\bar{X} = 7,96 \text{ g\%}.$$

Die Grenzwerte sämtlicher untersuchten Tiere liegen zwischen 5,53 und 9,94 g%.

Trotz der Schwankungen innerhalb der Altersgruppen ist deutlich zu sehen, daß der durchschnittliche Gesamteiweißwert vom Saugalter bis zum Alter von 7 Jahren um mehr als 2 g% zunimmt.

### Die Gestaltung der Serumeiweißfraktionen

Welche Verschiebungen in der prozentualen Verteilung der Eiweißfraktionen durch veränderte Umweltfaktoren hervorgerufen werden, zeigt deutlich CHOPARDS Versuch [3], der aus Bern (550 m) Kaninchen in eine Höhe von 3450 ü. M. brachte. Derselbe Autor stellte den bedeutenden Einfluß des Alters als eines physiologischen Zustandes auf die Verteilung der einzelnen Fraktionen fest, als er im Serum neugeborener Kälber gamma-Globulin überhaupt nicht oder nur in verschwindend geringer Menge fand, demgegenüber jedoch einen 22%igen gamma-Globulingehalt im Serum vollentwickelter Rinder. Der Albuminwert im Serum der Kälber erreichte zugleich sogar 80%, im Gegensatz zu dem 52%igen Albumingehalt im Serum der Kuh. TÖLGYESI [14] vermochte Globuline im Serum neugeborener Fohlen praktisch überhaupt nicht

festzustellen. GRIGOREW [7] fand bei Pferden mit zunehmendem Alter eine Erhöhung des Gesamteiweißwertes und die Senkung des A/G-Quotienten. DUNLAP und DICKSON [4] beobachteten im Serum von Schafen bei der Untersuchung des Einflusses, den derselbe Faktor ausübt, relative Vermehrung der Globuline. BARBARIAK und Mitarbeiter [1] sowie TÓTH und LABÁTH [13] verglichen die Verteilung der Serumeiweißfraktionen bei verschiedenen Arten im intrauterinen Leben und ermittelten bedeutende Abweichungen, die sie auf die Verschiedenheit des Plazentatypus zurückführten.

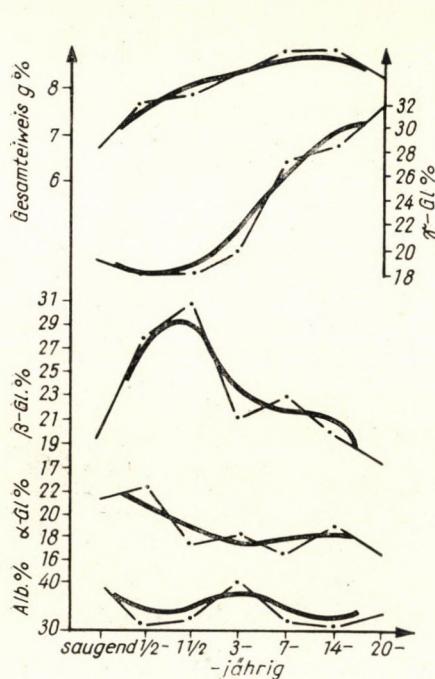


Abb. 1

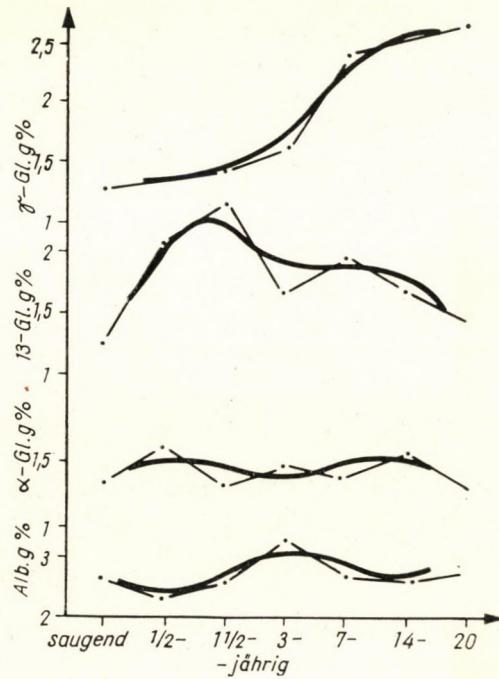


Abb. 2

Über die Serumeiweißfraktionen der vollentwickelten Pferde orientieren nachfolgende Literaturangaben:

Autoren	Albumin %	Alpha- Globulin %		Gamma-
		Beta-	Gamma-	
CHOPARD [3] .....	40,9	18,5	19,1	21,5
WUNDERLY—LEEMANN [15] .....	40,9	15,0	21,4	21,8
GEINITZ [5] .....	32,4	17,0	23,0	27,5
STOCKL—ZACHERL [11] .....	35,5—45,5	11,2—20,8	11,2—20,8	19,5—36,2
TÖLGYESI [14] .....	43,6	16,0	19,4	21,0

Tabelle 2, Abb. 1 und 2 veranschaulichen die eigenen Untersuchungsergebnisse, d. h. die prozentuale Verteilung der einzelnen Fraktionen in den verschiedenen Altersgruppen. Es sei hier bemerkt, daß es CHOPARD [3] in einigen Fällen gelungen ist, innerhalb der alpha- und beta-Fraktion Unterfraktionen zu trennen. In den eigenen Versuchen konnte in 7 Fällen die alpha- und in 7 Fällen (aber nicht immer im Serum derselben Tiere) die beta-Fraktion in weitere zwei Unterfraktionen getrennt werden.

Tabelle 2

Fraktionen	Alter (Jahre)						
	Saugfohlen	½	1½	3	7	14	20
Albumin %	40,0	31,4	33,0	40,4	32,7	31,6	34,4
„ g%	2,64	2,36	2,60	3,32	2,80	2,74	2,84
Alpha-Gl. %	21,2	22,3	17,5	18,2	16,6	19,1	16,6
„ g%	1,36	1,68	1,38	1,51	1,45	1,65	1,38
Beta-Gl. %	19,3	28,1	31,0	21,1	22,0	19,9	17,1
„ g%	1,25	2,14	2,44	1,73	2,0	1,73	1,47
Gamma-Gl. %	19,4	18,1	18,3	20,1	27,4	28,9	32,0
„ g%	1,31	1,40	1,44	1,66	2,40	2,52	2,65
A/G-Quotient	0,670	0,450	0,494	0,686	0,489	0,468	0,525

Die Entwicklung der einzelnen Fraktionen innerhalb der verschiedenen Altersgruppen, die Tendenz der Veränderungen, läßt sich an den Linien besonders deutlich verfolgen. Mit fortschreitendem Alter nimmt die Gesamteiweißmenge beinahe gleichmäßig zu, lediglich im Alter von 20—22 Jahren wird sie etwas niedriger. Am charakteristischsten unter den einzelnen Fraktionen ist die Entwicklung der beta- und gamma-Globulinfraktion in Abhängigkeit vom Alter. Bis zum Alter von 1½ Jahren vermehrt sich die beta-Fraktion kräftig (und ist die Abweichung zwischen den Altersgruppen signifikant), anschließend verringert sie sich ungleichmäßig. Im Gegensatz dazu vermehrt sich die gamma-Fraktion erst nach dem 3. Lebensjahr sehr stark, und zwar bis zum hohen Alter, wonach die beta-Fraktion in diesen Lebensstadien relativ und auch in g% abnimmt. Es scheint, daß sich die gleichmäßige Vermehrung der Gesamteiweißmenge anfangs aus der beta-Globulin-Zunahme ergibt und dann um das 3. Jahr die Verminderung dieser Fraktion durch die Vermehrung der gamma-Globulinfraktion kompensiert, ja auch die Gesamteiweißmenge bis zum hohen Alter weiter erhöht wird. Die Zunahme der gamma-Globulinmenge in g% bzw. die Unterschiede zwischen den Altersgruppen haben sich als signifikant erwiesen, da der p-Wert kleiner ist als 5%. Die Schwankung des alpha-Globulinwertes ist nicht charakteristisch. Serumalbumin verändert sich innerhalb der

Altersgruppen um relative Werte von 30—40% und läßt sich mit einer regelrechten Wellenlinie charakterisieren, wo die höchsten Werte im Saugfohlenalter und im Alter von 3 Jahren vorkommen. Weiterhin ist zu beobachten, daß die starke Erhöhung der beta-Fraktion in der Zeit der kräftigen Entwicklung von der relativen Senkung der alpha-Globulin- und Albumin-Fraktion begleitet wird.

Im Verlauf der ontogenetischen Entwicklung des Pferdes zeigt der A/G-Quotient die bezeichnenden Verschiebungen innerhalb der Fraktionen nicht an, weil sich die Schwankungen der Globulinfraktionen größtenteils ausgleichen. Auch aus diesen Resultaten geht hervor, daß es richtiger ist, statt des A/G-Quotienten die Verschiebungen zwischen den einzelnen Fraktionen zu berücksichtigen, wie dies auch in der Humandiagnostik geschieht.

### *Die Veränderungen im Fibrinogengehalt des Plasmas*

Über den in mg% angegebenen Fibrinogengehalt unterrichten Tabelle 3 und Abb. 3. Im Serum sämtlicher untersuchten Tiere beträgt der Fibrinogengehalt im Mittelwert  $\bar{x} = 402$  mg%

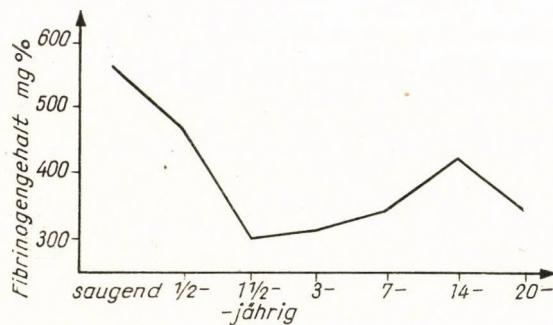


Abb. 3

Tabelle 3

Saugfohlen	Alter (Jahre)					
	½	1 ½	3	7	14	20
668	360	350	300	480	470	370
519	685	305	379	390	420	420
496	435	285	318	380	507	—
710	590	270	270	280	410	330
370	350	350	350	230	380	210
600	390	240	270	280	240	390
$\bar{x} = 560$	465	300	314	340	421	344

Dieser Wert stimmt mit den in der Literatur mitgeteilten überein. Es scheint beachtenswert, daß vom Saugfohlenalter bis zum Alter von 1½ Jahren eine etwa 260 mg%ige Senkung der Fibrinogenmenge in Erscheinung tritt, die danach allmählich über 400 mg% steigt und erst im Alter von 20—22 Jahren wieder etwas abnimmt.

### *Die Ergebnisse der Thymol- und Kadmiumproben*

Neuerdings hat man nachgewiesen, daß die quantitative Veränderung der Eiweißfraktion auch einen qualitativen Unterschied bedeuten kann, indem ein Teil der vermehrten Menge aus pathologischen, atypischen Fraktionen besteht, unabhängig davon, an welche Globulinfraktion sie gebunden sind. In diesem Fall spricht man von einem auch funktionell veränderten Eiweiß bzw. von der Anwesenheit pathologischer Eiweißstoffe. Nachdem wir mit fortschreitendem Alter der Pferde eine bedeutende Gesamteiweiß- und innerhalb derselben beta- sowie gamma-Globulinvermehrung beobachtet haben, schien es nicht uninteressant, zu untersuchen, ob an dieser Eiweißvermehrung nicht die bei Paraproteinämie charakteristischen pathologischen Fraktionen beteiligt sind. Derartige Spektrumveränderungen der Plasmaineiweiße werden z. B. von der Thymol- und Kadmiumprobe angezeigt. In der Humandiagnostik betrachtet man bis zu 4 Thymol-Einheiten das Eiweißspektrum als normal. Bei den untersuchten Pferden traten in sämtlichen Fällen wesentlich niedrigere Werte — durchschnittlich 1,26 Thymol-Einheiten — zutage. Zwischen den Altersgruppen bestand keine Abweichung. Eine positive Kadmiumreaktion war niemals zu beobachten. Aus diesen Ergebnissen darf geschlossen werden, daß bei gesunden Tieren mit zunehmendem Alter keine wesentliche Veränderung im Eiweißbildungssystem eintritt und die Fraktionen als Eiweiße mit normalem Aufbau zu betrachten sind.

### **Besprechung**

Die g%-Gesamteiweißwerte sind im allgemeinen höher als die bei einzelnen angeführten Untersuchungen ermittelten, weil bei der refraktometrischen Bestimmung die Extinktion den reinen Lösungen gegenüber von den Lipoiden etwas erhöht wird. Auch verändert sich bekanntermaßen im Verlauf der Ontogenese das Eiweiß-Lipoidverhältnis zugunsten der Lipoide. Die im Gesamteiweißwert und in den Serum eiweißfraktionen altersgruppenweise zutage getretenen Unterschiede können indessen nicht hierdurch hervorgerufen worden sein, weil die Abweichungen der Fraktionen in g% mit der Gestaltung des Gesamteiweißwertes im Einklang stehen.

Bei den eigenen Untersuchungen fanden wir im Serum der Saugfohlen beträchtliche Globulinmengen und eine ansehnliche gamma-Globulinmenge. Mehrere Autoren [9, 12, 13, 14] haben die Differenzen im Serumeiweiß- und gamma-Globulingehalt der neugeborenen und Saugtiere untersucht und festgestellt, daß Gesamteiweißwert und gamma-Globulingehalt nach dem Verbrauch des Kolostrums sprungartig zunehmen. Das wird auf die direkte Resorption der an die Globuline gebundenen Antikörper zurückgeführt. LARSON und TOUCHBERRY [9] weisen darauf hin, daß die Gesamteiweißmenge im Serum damit keineswegs das für vollentwickelte Tiere bezeichnende Niveau erreicht, weil dieses im Laufe der Jahre weiter steigt. Nach den eigenen Untersuchungen geht diese Zunahme ununterbrochen bis zum hohen Alter vor sich. Es ergibt sich indessen die Frage, ob die von LARSON und TOUCHBERRY an Rindern und von uns an Pferden gewonnenen Resultate, die zur Zeit der kraftvollen Entwicklung die Vermehrung vor allem der beta-, später hauptsächlich die der gamma-Globuline zeigen, mit der durch das Altern bedingten Vermehrung der Immunstoffe zufriedenstellend erklärt werden können. Fraglich scheint uns weiterhin, ob die bei der Vermehrung der beta- und gamma-Fraktionen wahrnehmbare Periodizität nicht im ersten Fall mit dem Umsatz der Lipo- und im zweiten Fall mit dem der Glykoproteide im Zusammenhang steht. Könnte man nicht ferner daran denken, daß die mit dem Altern eintretende Stoffwechsel-senkung mit der Vermehrung der relativen und absoluten Mengen der im Transport eine geringere Rolle spielenden Fraktionen (Globuline) im Zusammenhang steht?

Aus den Resultaten geht auch hervor, daß die g%-Menge des gamma-Globulingehalts mit dem in Tagen ausgedrückten Alter der Saugfohlen nicht parallel verläuft. Das Alter variierte zwischen 3—73 Tagen. Es scheint, daß die Erhöhung des Serumglobulinspiegels eher von der Menge der mit dem Kolostrum resorbierten Immunkörper als vom Alter abhängt.

#### LITERATUR

1. BARBORIAK, J. J., DE BELLA, G., SETNIKAR, I., KREHL, W. A. (1958) Age related changes in plasma proteins of the fetal goat. *Am. J. Physiol.*, **193**, 89—91.
2. BOGUTH, W. (1954) Paper electrophoretic serum examination of domestic mammals. II. *Zbl. Veterinärmed.*, **1**, 311—329.
3. CHOPARD, P. (1954) Bestimmung der Eiweißfraktionen des Blutserums bei den Haustieren mit der Papierelektrophorese, unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren. *Z. Tierzüchtg. Züchtungsbiol.*, **63**, 21—52.
4. DUNLAP, J. S., DICKSON, W. M. (1955) The effect of age and pregnancy on ovine blood protein fractions. *Amer. J. Vet. Res.*, **58**, 91—96.
5. GEINITZ, W. (1954) Über Serumeiweiße von Tieren, die häufig als Versuchstiere oder zur Gewinnung von Heilseren dienen. *Klin. Wschr.*, **32**, 1108—1111.
6. GERENDÁS, M. (1956) A véravadás zavarainak korszerű vizsgálata. Moderne Untersuchung von Blutgerinnungsstörungen. *Vértranszfúziós Közlemények*, **1**, 42—64. (Ungarisch.)
7. Григорьев, Н. Г. (1957), Изменения белков в крови у растущих лошадей. *Вестн. сельскохоз. наук*, (2), 118—124.

8. KUTHY, S., JUHÁSZ, B. (1953) Biokémia. Biochemie. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. (Ungarisch.)
9. LARSON, B. L., TOUCHBERRY, E. W. (1959) Blood serum protein level as a function of age. *J. Anim. Sci.*, **18**, 983—990.
10. MUNKÁCSI, F. (1959) Die Veränderung einzelner Bluteigenschaften mit dem fortschreitenden Alter der Pferde. Dissertation, Gödöllő. (Ungarisch.)
11. STÖCKEL, W., ZACHERL, M. K. (1953) Paper electrophoretic studies of bovine and horse serum. *J. Physiol. Chem.*, **293**, 278.
12. TÓTH, B. L. (1958) Beiträge zur Entwicklung der Serum eiweiße im Laufe der Ontogenese. *Acta Physiol. Hung.*, **12**, Suppl. 45.
13. TÓTH, B. L., LABÁTH, G. (1959) Die Veränderung der freien und Eiweißaminosäuren des Serums in der Ontogenese. *Acta Physiol. Hung.*, **16**, Suppl. 94.
14. TÖLGYESI, Gy. (1959) Papierenkrophoretische Eiweißuntersuchungen. *Acta Vet. Hung.*, **9**, 43—54.
15. WUNDERLY, Ch., LEEMANN, W. (1947) Über neue klinisch-chemische Untersuchungsergebnisse an Pferdeblut. *Schw. Arch. Tierh.*, **89**, 373—383.

#### CORRELATION BETWEEN THE AGE OF HORSES AND CHANGES IN THE FRACTIONS OF THEIR SERUM PROTEINS

Total amount of serum proteins, their electrophoretically separated fractions and fibrinogen contents of the blood plasma were analysed in light horses of the same breed with a view to studying the influence of age. It was attempted to conclude from the results of thymol and cadmium tests on the appearance of pathologic protein fractions. The age of the horses used in the investigations covered a range from newborn to 20 year old animals.

The amount of total protein rises steadily with advancing age. The increase of protein level is due to the growing amount of the  $\beta$ -globulinfraction up to the age of  $1\frac{1}{2}$  years, while in the further stages of ontogenesis almost exclusively to an increase in the absolute amount of the  $\gamma$ -fraction. Age does not seem to occasion significant and characteristic changes in the concentration of albumin and  $\alpha$ -globulins. The fibrinogen contents of the blood plasma decreased by nearly 50 per cent during the first 18 months of the animal's life and began to rise subsequently. Results of thymol and cadmium tests do not justify the supposition that the increase in the concentration of serum proteins, becoming more and more pronounced with advancing age, is due to a higher proportion of pathologic fractions. It moreover results from the tests that conclusions based on the fractions of serum proteins without due regard to the age factor may lead to erroneous diagnoses. It further seems that, with advancing age, fractions vitally important for the organism's protection tend to increase.

#### ИЗМЕНЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ В КРОВИ С ВОЗРАСТОМ ЛОШАДЕЙ

В целях изучения влияния возраста авторы исследовали общее количество белков, отделенные с помощью бумажного электрофореза фракции белков в сыворотке, далее количество фибриногена в плазме крови теплокровных лошадей одинакового пола, содержанных на конном заводе. Из результатов проб тимола и кадмия они попытались получить опорные точки относительно появления патологических белковых фракций. Возраст подопытных лошадей был от сосущего периода до 20 лет.

Количество общих белков непрестанно возрастает с возрастом. Повышение белков обусловливается до полутора-летнего возраста повышением количества фракции бета-глобулина, а в дальнейших периодах индивидуального развития — почти исключительно повышением абсолютного количества гамма-фракции. Изменение альбумина и алфа-глобулина в функции возраста незначительно и не типично. Содержание фибриногена в плазме уменьшалось до полуторалетнего возраста почти на половину, а затем оно вновь повышалось. Из результатов проб тимола и кадмия нельзя заключить, что повышение концентрации сывороточных белков по мере старения обусловливается якобы повышенным присутствием патологических фракций. Результаты подтверждают и то, что сделанные на основе белковых фракций в сыворотке заключения, без учета возраста, могут привести к ошибочному диагнозу. Далее можно предполагать, что по мере старения повышаются жизненно важные для защиты организма фракции.

FERENC MUNKÁCSI, Gödöllő, Nyisztor tér 3. Ungarn.



# AGE AT MENARCHE, ACCELERATION AND HERITABILITY

A. THOMA

ANTHROPOLOGY DIVISION (HEAD: J. NEMESKÉRI), MUSEUM OF NATURAL HISTORY, BUDAPEST

(Received March 10, 1960)

## Summary

Probit analysis has shown the median age at menarche  $12.75 \pm 0.08$  years in 414 schoolgirls in Budapest. This represents a great acceleration, as compared with earlier and recent data for Hungary and other countries. On the basis of heritability calculations it is suggested that in addition to the direct peristatic factors the accelerated rate of maturation is due to a selective process associated with urbanization, as it has been claimed by PORTMANN.

## Factors influencing the onset of menarche

In the continuous process of the maturation of females the appearance of the first menstruation represents a sharply defined point. According to FEKETE [6] "the age at menarche depends on when the central nervous-hypophysis system reaches the required grade of function and when the ovaries are ready adequately to respond to impulses coming from higher centres". To the continuously coming endogenous and exogenous impulses the organism responds with a quantal reaction with the onset of menstruation associated in normal conditions with the maturation and detachment of ova. Thus, the menarche is a highly suitable *indicator* in studies on the biological process of maturation, although of course its onset does not actually mean that the organism may be considered to be sexually mature.

The age at menarche, varying individually from 8 to 24 years in the world-wide population, is influenced by many factors, which we should like to illustrate by selecting a few data from the extremely voluminous literature on the subject. (i) *Climate*. It is common knowledge that in warm climates maturation results earlier than in the northern areas, although this is no absolute rule [5]. According to MILLOT [14] the age at menarche is 11 to 13 years in South China, 12 to 14 in Middle China and 14 to 16 years in North China. The detailed studies by ŠKERLJ [18] have shown that the menarche is influenced by the average annual temperature, the annual amplitude of temperature variations, the amount and seasonal distribution of rainfall, the humidity of the air and by the altitude over the sea level. Menarche comes on earlier in the oceanic and later in the continental climate. (ii) *Nutrition*. It was also ŠKERLJ [20] to point out for the first time that the protein content of the diet had a

great influence on the age at menarche. According to the investigations of KRALJ—ČERČEK [11] in Slovenia the mean age at menarche of the girls on high-protein diet was  $12.65 \pm 0.133$  years, of those on mixed diet  $13.42 \pm 0.145$  years and of the girls on preponderantly high-carbohydrate diets  $14.1 \pm 0.111$  years. The differences are statistically significant. (iii) *Social status.* Two sources are quoted, both analysing the mean age at menarche by dividing the material into groups of "good", "intermediate" and "poor", according to social origin or standing. According to MILLOT [14] in Paris the mean age at menarche was 13 years 8 months in the "good", 14 years 5 months in the "intermediate" and 14 years 10 months in the "poor" group. In Slovenia KRALJ—ČERČEK [11] found the following values:  $13.28 \pm 0.134$ ,  $13.71 \pm 0.104$ , and  $14.2 \pm 0.282$  years, respectively. The latter author pointed out that in his material no correlation existed between the social standing and the three types of nutrition, thus, in the category under the heading "social status" factors independent of nutrition are also involved. It has also been reported that menarche occurs earlier in urban than in rural areas. This might be due among others to the fact that city children are exposed earlier and to more sexual stimulation than the country children. (iv) *Secular changes.* It is known that in civilized countries an acceleration of growth and maturation has been in progress for about a century. Correspondingly, the age at menarche tends to decrease. Around 1880, in the Netherlands the mean age at menarche was 15 years, 3 months, 20 days, while in the second third of the 20th century it was 13 years, 9 months and 15 days [14]. The causes of acceleration will be analysed in detail later. We disagree with HOCBEN *et al.* [9] who have claimed that the secular trend observed would be due simply to a systematic error in recording. MICHELSON [13] analysed the data for a Negro orphanage in the USA, where precise records had been kept of the age of menarche for decades. According to his significant data the mean age at menarche was

14.3 years in 1910—1914

13.3 years in 1920—1924

13.07 years in 1935—1940.

It is remarkable that the acceleration of maturation is accompanied by a delay in the onset of the menopause [cit. 1]. (v) *Constitutional correlations.* Within the same population the more darkly pigmented girls usually began to menstruate earlier than those with lighter pigmentation [17]. KRALJ—ČERČEK [11] has divided Slovenian girls into three groups according to body build:

1. Baroque: broad body build, feminine,
2. Renaissance: medium, and
3. Gothic: linear or boyish type.

In group 1 the mean age at menarche was  $12.93 \pm 0.222$ , in group 2  $13.5 \pm 0.104$ , and in group 3  $14.61 \pm 0.134$  years. The differences are significant by the *t* test. (vi) *Heredity*. Twin and familial studies have proved that genetical factors have an intense influence on the age at menarche. STERN [21] cites PETRI's data for the age at menarche of pairs different in the grade of relativity:

	Difference
51 monozygotic twins .....	2.8 months
47 dizygotic twins .....	12.0 months
145 siblings .....	12.9 months
120 mothers-daughters .....	18.4 months
120 non-related females .....	18.6 months

The heritability gradient is unmistakably present. The difference between mothers and daughters is greater than that between sisters, but it would be far-fetched to claim on this basis that non-additive, or non-autosomal gene effects would be responsible, because the childhood peristasis is much more different in the case of mothers and daughters than in that of sisters.

On the basis of the above data I have tried to make a gross assessment of the degree of heritability. According to LERNER [12] the phenotypic variation of a character is composed of four components: the genotypic and peristatic (environmental) variation, the correlation between the two and the interaction of the two. This may be expressed by the following formula:

$$\sigma_P^2 = \sigma_{Ge}^2 + \sigma_E^2 + 2r_{Ge} + f(GeE).$$

The two right last members of the formula may be disregarded in animal breeding experiments, or it may be satisfactorily assessed. However, in human genetics they often represent a significant, disturbing factor, especially so in studies on psychic properties. Man is not a toy of heredity and environment, but faces actively and selectively his environment. For example: a child with inherited talent for music usually has music-loving parents, who will in all likelihood give the child a chance to learn music. Thus, heredity and peristasis are in a positive correlation with one another. On the other hand, the greater the inherited talent, the more pleasure will be derived from music by the individual, the more impulses it will give for learning music. Thus, in this case heredity and peristasis are in a multiplicative interaction with one another. Let us now start from the usual procedure, *i. e.* let us assume a simple additivity of heredity and peristasis and leave the right two members unconsidered. The genotypic variance may be broken up into the components of additive effects, dominance and epistasis, or in general into the components of genetical interaction:

$$\sigma_{Ge}^2 = \sigma_G^2 + \sigma_D^2 + \sigma_I^2.$$

The investigations made thus far showed only the first component to be significant. Thus, the simplified formula of heritability is

$$h^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_E^2}.$$

The peristatic variation is represented by the variance computed from the differences for monozygotic twins, the genotypic variation by the difference between the variances for dizygotic twins (*i. e.* random pairs) and the monozygotic twins. In the given case an inaccuracy factor is introduced into our estimate by the fact that not the standard, but the mean deviation is given for the age at menarche. This is then computed for standard deviation, on the basis of the relation existing in the case of normal distribution ( $\sigma = 1.25 s$ ). The value obtained should be multiplied by 0.5, because in the present case we need the standard deviation not of the differences, but of the individual values [2]. Thus, the values for the three parameters are:

$$s_{MZ} \approx 1.75 \text{ months}$$

$$s_{DZ} \approx 7.5 \text{ months}$$

$$s_{RP} \approx 11.7 \text{ months.}$$

For  $h^2$  an upper and a lower limit can be given, according to the following formula:

$$\frac{s_{RP}^2 - s_{MZ}^2}{s_{RP}^2} > h^2 > \frac{s_{DZ}^2 - s_{MZ}^2}{s_{DZ}^2}.$$

DAHLBERG [2] has namely stated that the dizygotic twins realize only the genotypic variation within the family and not the heritable variation possible in the population that is certainly greater. On the basis of his data for Sweden with the metric human properties the standard deviation for dizygotic twins is merely about  $\frac{1}{2}$  of the corresponding standard deviation for the population. On the other hand, the difference in peristasis was much greater within the random pairs than within the twins. By the method given, the heritability estimate of ours for the age at menarche is

$$97.7 \text{ per cent} > h^2 > 94.5 \text{ per cent.}$$

This value for heritability is in our opinion grossly overestimated or exaggerated. It suffices to remember the variation caused by the high-protein diet in the age at menarche. Computed from the data of KRALJ-ČERČEK [11]

the value of the intraclass correlation measuring the effect of the nutritional factor is very high:  $r' = 0.951$ . It is theoretically conceivable that in the field of one property, by keeping the peristatic factor stable, in a selective way a population may be rapidly modified and at the same time the phenotype of a genetically homogenous strain may be shifted by changing the nutritional factor. But such a measure of contradiction is completely incompatible, even when the informations originate from two different materials. Thus, the validity of the starting hypothesis has to be doubted.

The incompatibility may be caused exclusively by a neglecting of the correlation and interaction, which proves in an astonishing, but probably not extraordinary way the effect of psychic factors on the menarche. The heritability estimation based on the additive theorem considers the phenotype of the individual to be the resultant of the impulses coming from the genotype and peristasis, independent from one another, and randomly distributed as far as direction is concerned. Thus, the organism is looked upon as being a *passive system*. This hypothesis seems to be applicable to cattle only; in the first place. Nervism teaches us that in man psychic life has a profound influence upon purely physiological functions (e. g. on the sexual cycle of adult women). It is much more plausible that in the field of all such properties as are in a direct or indirect relationship with the psyche, the human organism should be looked upon as being an *active system*, which interferes with the mode heredity and peristasis take effect by. If we apply the criteria of the active system to the age at menarche and if a positive correlation and multiplicative interaction are assumed to exist between heredity and peristasis, the following heritability approximation may be introduced:

$$\frac{\log_e s_{RP} - \log_e s_{MZ}}{\log_e s_{RP}} > H > \frac{\log_e s_{DZ} - \log_e s_{MZ}}{\log_e s_{DZ}}.$$

By this method the following limiting values are obtained for the heritability of the age at menarche:

$$88.2 \text{ per cent} > H > 72.2 \text{ per cent}.$$

Taking into account the inaccuracy factors and the obvious exaggeration of the assumption that the correlation is +1, we can merely state that heritability cannot be lower than 70 per cent in value. This estimate is obviously nearer to reality. It may be pointed out that even so the degree of heritability is very considerable.

(vii) *Race*. The differences between the human races are very difficult to investigate methodologically, because differences between the races may be greatly overlapped by several other factors influencing the age at menarche.

The existence of racial differences is made theoretically likely, though not absolutely proved, by the high heritability. MICHELSON [13] has found only insignificant differences between American negroes and whites. A counter-example, in which the peristatic factors are relatively homogenized: with the Lapps the mean age at menarche is 18 years, while with the Angmassalik Esquimos it is 14 years and 9 months [14].

### Own investigations

The anthropological and gynaecological literature contains but scarce and rather unreliable evidence as to the age at menarche in Hungary. The 1943 edition of the Gynaecology by FRIGYESI [8], relying upon data from the early 20th century, estimates the onset of menarche at 15.5 years, at an average, while in the new text-book of gynaecology published in 1955 the mean age at menarche is suggested by FEKETE [6] to be 13 to 14 years. These data were based at least in part on clinical patient material, which by itself means a one-sided selection. Even the mode by which the data are recorded and made public is usually erroneous. In general, the date of birth and the date of the first menstruation are recorded and an arithmetic mean is calculated from the data for the age of menarche. This method is unsatisfactory. If we question an adult age group, they will usually be unable to supply reliable information. According to MICHELSON [13] only about 50 per cent of 7000 girls questioned could supply information accurate for months, and this a few years after the first menstruation. This defect in memory may cause an error comparable with the age groups (usually 1 year) used. On the other hand, if we collect information from girls in puberty, some of whom do not menstruate yet, we shall work with a certain bias, as a result of which the sample mean will be lower than the population mean. Since we can obtain information only from those who do menstruate already, those starting menstruation at a relatively advanced age will be systematically omitted from study. Thus, a correlation exists between the aim of the investigation and the viewpoints of collection of data.

The correct method is the following one: the date of birth, the date of collecting information are recorded and the subject is asked whether she has menstruated already or not. All three data can be definitely determined in every case. The material should be divided into relatively narrow age groups and the percentage already menstruating within one group computed. If we have homogeneous samples of sufficient size, the distribution pattern thus obtained may be looked upon as being the summation curve of the ages at menarche, or the response curve of the quantal reaction given to increasing doses of time, as a stimulus. According to every investigation reported on thus

far the age at menarche follows the normal distribution, and thus the response curve assumes the normal sigmoid form. This curve may be straightened by probit transformation. From the transformed data we may by probit analysis [see 7] estimate various parameters: the regression coefficient ( $b$ ), the median ( $m$  = the point of time at which 50 per cent of the girls already menstruate, while the other 50 per cent do not), and their corresponding standard deviations. With normal distribution the value of the median will be the same as that of the arithmetic mean, thus the median determined by probit analysis will at the same time mean an estimation also of the mean age at menarche.

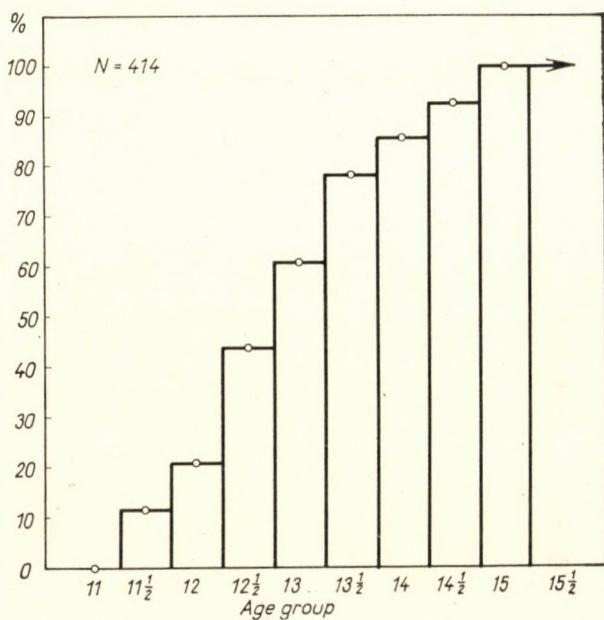


Fig. 1. Empirical distribution of the frequency of menstruating girls

In the course of 1959 we have collected data from schools in District II of Budapest, including all girl and coeducation classes VI., VII., and VIII. of the public schools in the Lorántffy, Fenyves and Törökveszi Streets. Of the twins only the ones coming first in the roll-call were included. As it is compulsory to attend public school, the sample may be considered to be representative, at least for the second district of Budapest. Only the imbecile girls attending special schools were left out of study, which is an advantage. My aim was to obtain a suitable picture of the population as a whole and therefore the material was not divided into subgroups. The social distribution was rather one-sided: 13 per cent of the parents were workers, 87 per cent intellectuals. Today, and especially in Budapest, there are no longer great differences in nutritional, sanitary and housing conditions between the single

strata of the population. The data for the 414 girls were divided into  $\frac{1}{2}$ -year age groups, on the basis of the formula: half year completed  $\pm 3$  months. The data were collected by Mrs. A. THOMA. I make use of the occasion to express my thanks also here to Professor Božo ŠKERLJ (Ljubljana) for his communication by mail.

The crude data are to be found in Table 1. We have been lucky in catching the menarche period: about 50 per cent fell both to the menstruating and non-menstruating groups. In our sample the onset of menarche is at 11.5 to 14.5 years. At 11 none, from 15 onward all of the girls menstruate. The distri-

**Table 1**  
*Age group frequency of menstruating girls*  
(Budapest sample, 1959)

Age years	Menstruation		No menstruation		Total
	N	per cent	N	per cent	
11	0	0	21	100.0	21
11½	6	11.5	52	88.5	58
12	11	20.4	43	79.6	54
12½	30	43.5	39	56.5	69
13	43	60.6	28	39.4	71
13½	58	78.4	16	21.6	74
14	36	85.7	6	14.3	42
14½	12	92.3	1	7.7	13
15	9	100.0	0	0	9
15½	1	100.0	0	0	1
16	2	100.0	0	0	2
Total	208	—	206	—	414

bution pattern is represented graphically by the histogram in Fig. 1. It is clear that the frequency of menstruating girls follows the normal sigmoid curve. The good fit of the empirical probits to the regression line (Fig. 2, showing the probit transformation) demonstrates the normality and homogeneity of the material. The figure may be useful also for making individual comparison by the doctor: he may readily judge the percentage of the population a girl menstruating or not menstruating at a given point of time corresponds to. The probit analysis is shown in Table 2. The good fit and the homogeneity (the value of  $\chi^2$  is much lower than the degrees of freedom) made it unnecessary to employ the maximum likelihood estimation, which is time-consuming. It is also proved that the number of girls tested was sufficient from the point of view of the information we have sought. The median:

Table 2

Computation of the probit-regression equation of the age and menarche, with the more important parameters

<i>x</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	Empirical probit	<i>Y</i>	<i>P</i>	<i>nP</i>	$\frac{(r-nP)^2}{nP(1-P)}$	<i>nw</i>	<i>nux</i>
14.5	13	12	92.3	6.43	6.56	94.1	12.2	0.05	3.09	44.805
14	42	36	85.7	6.07	6.12	86.9	36.5	0.05	17.01	238.140
13.5	74	58	78.4	5.79	5.67	74.9	55.4	0.49	39.37	531.495
13	71	43	60.6	5.27	5.23	59.1	41.9	0.07	44.52	578.760
12.5	69	30	43.5	4.84	4.78	41.3	25.5	0.13	43.26	540.750
12	54	11	20.4	4.17	4.34	25.5	13.8	0.76	28.73	344.760
11.5	58	6	11.5	3.80	3.89	13.4	7.8	0.48	23.49	270.135
								2.03	199.47	2548.845

$$b = 0.889$$

$$m = 12.75$$

$$\bar{x} = 12.778$$

$$Y = 0.889 x - 6.33$$

$\chi^2_{[5]} = 2.03$ ; probability  $90 > P > 70$  per cent, no heterogeneity!

$$Snux^2 = 32685.744$$

$$(Snux)^2/Snw = 6496610.834/199.47 = 32569.36$$

$$Snw(x - \bar{x})^2 = 116.384$$

$$V(b) = 1/116.384 = 0.0085$$

$$s_b = 0.092;$$

The 95 per cent fiducial limits for regression coefficient (*b*): 0.709—1.069

$$V(m) = \frac{1}{0.889^2} \left\{ \frac{1}{199.47} + \frac{(12.75 - 12.78)^2}{116.384} \right\} = 0.00634$$

$$s_m = 0.08.$$

The 95 per cent fiducial limits for the median (*m*): 12.59—12.91 years.

$12.75 \pm 0.08$  years; the corresponding value for the population may be with this estimation 2 months higher or lower, *i. e.* we have succeeded in determining relatively precisely the probable age at menarche. The standard deviation for the distribution of the age at menarche:  $s = 1/b = 1.12$  years.

### Comparative evaluation

We are going to evaluate our data mainly from the point of view of *puberty acceleration*. I have found that at least in Budapest, 13 years is generally believed to be the mean age at menarche. The value we got from our calculations: 12 and  $\frac{3}{4}$  years is significantly lower (at the 0.1 per cent level). A com-

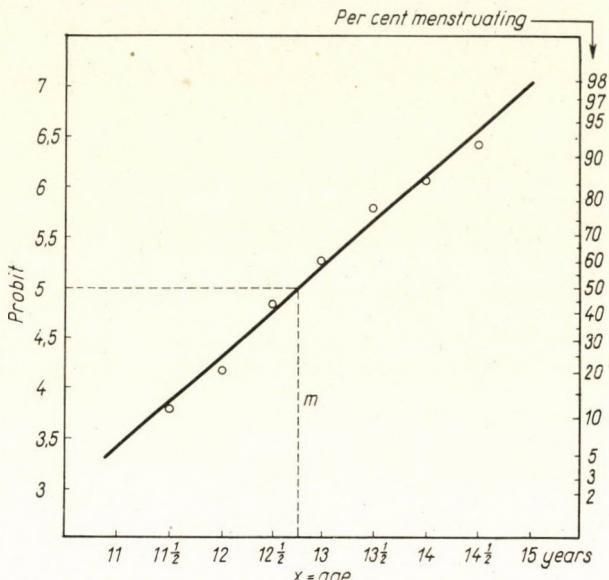


Fig. 2. Probit regression line showing the correlation between menarche and age

parison with data for this and other parts of Hungary is rendered difficult by the differences in the methods employed. One century ago such a distinguished gynaecologist as SEMMELWEIS [cit. 10] estimated the age at menarche to be between 15 and 19 years. We have two data for Hungary from the end of the 19th century. DOKTOR [cit. 10] in 1892 estimated 15 years and 4 months. JANKOVICH [10] found the mean age at menarche to be 15 years and 6 months in the 1880—1893 material of the Department of Gynaecology, Medical University of Budapest. The same author computed from the 1936 material of the same Department exactly 14 years as the mean age at menarche. Considering that this material included adult women, this value relates to the first quarter of the 20th century. JANKOVICH also studied two samples of adolescent girls in the middle of the 1930-ies in Budapest and found the mean age of menarche of 5000 apprentice and working girls to be 13 years. The real mean must certainly have been higher in value, because 579 of those questioned did not menstruate yet at the time of questioning. At the same time, 343 commercial high school girls were also examined and the mean age at menarche was found to be 13 years. The author fails to mention whether there had been any of the girls not menstruating yet at the time of questioning, but it should be borne in mind, that under the given conditions the high school represented a social selection. Taking into account also the inaccuracy of the determinations, the 1959 evidence for Budapest, as compared with the earlier ones, testifies of a substantial acceleration of maturation. From the years following World War II we have data from two small country towns. The only correct publication found in the material reviewed is the one by VÉLI [22], who reported

on his studies involving 946 Kaposvár schoolgirls, in 1947/48. VÉLI gave the incidence of menstruating girls in the single age groups. From his data I have estimated the median by probit analysis and I found it to be  $m = 13.9$  years. EIBEN [4], in 1957, questioned 90 high school girls in Körmend as to the age at onset of menstruation. The median I got by graphic probit analysis from the summational table composed of his data was 13.2. The true value may be somewhat higher, as 7 of the girls did not menstruate yet at the time of the study. However, the real value may even so be lower than that for Kaposvár: acceleration can be substantiated also in the country areas. It is to be noted that the higher age at menarche for the girls of Kaposvár may be in part due to events connected with the war. A comparison of the 1957 data for Körmend with the 1959 ones for Budapest proves that acceleration in the capital is faster than in the country.

It is not worth while to compare data very distant from one another in time and space. According to ŠKERLJ [19] with Yugoslav, Slovak, Ukrainian and Norwegian girls the mean age at menarche was 14 years, with Finnish, Swedish, English and German girls it was 15 years in the 1930-ies. HOGBEN *et al.* [9] have examined the age at menarche of 662 girls by probit analysis, immediately after World War II, in Tottenham, England. They used the categories "no menstruation" "regular" and "irregular menstruation" and computed two kinds of median: "50 per cent infantile" and "50 per cent adult". We have not followed this method, because when menstruation began shortly before collecting the data there is no way to decide whether the individual will belong to the regular or irregular menstruation group. Thus, with our values those for the "50 per cent infantile" group may be compared:  $m = 14.0 \pm 0.75$  years. The Budapest median is 1 and  $\frac{1}{4}$  years lower than that, but the statistical significance of the difference is doubtful ( $t = 1.656$ ;  $10 > 10 > P > 5$  per cent). From the neighbouring countries we use the data collected in the 1950-ies by KRALJ—ČERČEK [11]. The mean age at menarche of 223 Slovenian girls was  $13.61 \pm 0.83$  years, that of 52 girls from the island of Susak in the Adriatic Sea was  $13.94 \pm 0.17$  years. Both values are higher than those obtained for Budapest. The author has determined the age at menarche with a day-accuracy. It is not mentioned how many (if any) of the girls had not menstruated at the time of collecting the data. If there were any such girls, the means will further increase and the difference between Budapest and Slovenia will be even greater. Further comparisons would be worth while making if we had any more recent, correctly collected data analysed by the probit method for Central and Eastern Europe. At any rate, it seems to be clear that the Budapest girls belong to the ones showing a marked acceleration as far as European girls are concerned.

The phenomenon of puberty acceleration represents a problem both from the biological and social point of view. It is in relation with such world-wide

phenomena as for example the anticipation of certain typical disease ages. Its causes are as yet obscure. An improvement of nutritional and sanitary conditions obviously has a role to play in it. But even more profound causes may be involved. Heterosis in man is still a matter of controversy. But it would not seem reasonable to deny right away that a break up of the breeding isolates by civilization [3] may interfere also with the phenomenon of puberty acceleration. If we assume on the basis of the mother-daughter and sister-sister differences a dominance of the accelerated type, the increase of heterozygosity would increase the frequency of the dominant phenotype. However, the fact that the phenomenon of acceleration is demonstrable also in Budapest, a city whose population has always been and is now mixed, contradicts at any rate this view.

We join the hypothesis of PORTMANN [16]. The Swiss author has suggested that the principal factors would be on the one hand a direct neuro hormonal stimulation acting through the hypothalamus-pituitary system and caused by urbanization and civilization, and on the other hand a *selective process* given rise to by the one-sided mental strain and requirements resultant from the same circumstances. Also PORTMANN assumes that people with increased reactivity would migrate into the towns. — The importance of the role of psychic stimuli has already been mentioned. In addition, the high heritability of the age at menarche indicates that the effect of genetic factors is not to be neglected. If it is realized that the mean age at menarche has decreased from a value of from 16 to 17 years to the present level, we may calculate with a change of at least 30 per cent.\* According to our heritability calculations this change has at least reached, but most probably has exceeded long ago the outermost limit of adaptability. Consequently, we are dealing with genetical changes, *i. e.* with an evolutional process. This process typically assumes the form of the BALDWIN effect, *i. e.* the direct adaptation to peristasis and the genetical changes point to the same direction. The question, which cannot be controlled, but must be left open is whether what we have on hand is not a process of genetic assimilation in the conception of WADDINGTON [23]. As regards the mechanism of selection, in the given case we tend to think of a

\* This value is obtained in the following way:

On the basis of the longitudinal series for Budapest, a decrease by at least 3 years of the age at menarche should be calculated with. According to the studies made thus far the standard deviation of the distribution of the ages at menarche is with a good approximation 1 year. If we accept the range of variation conventionally as  $2 \times 3\sigma$  including 99.73 per cent of the material, the shift wave will have passed the half interval. If taking the maximums the limits are drawn at  $\pm 5\sigma$ , the downward shift is 30 per cent.

Although it has been published in a well-known periodical, unfortunately I could gain access only after this paper had been completed to the original report by PETRI [15]. From the individual twin data published therein and by the use of DAHLBERG's formula [2] I could now precisely calculate the standard deviations, which have the following values:  $s_{MZ} = 2.57$  and  $s_{DZ} = 11.30$  months. On the basis of the new parameters the estimate for  $H$  is  $\geq 80$  per cent. It is therefore certain now that the change has exceeded the limits of the maximally 20 per cent adaptability.

pleiotropic coselection with the factors determining psychic properties. The civilized and urbanized mode of life directly increases the sexual susceptibility of those in puberty. On the other hand, the selection optimum set up by the same factors in the field of intelligence requirements favours correlatively the individuals more "responsive" also in the sexual field.

In social relations the effect of acceleration is just dramatic. The age limit of the ability to live a sexual life becomes lower and lower, while that of moral maturity and responsibility required for family life does not! On the other hand, production by ever improved methods and techniques requires longer and longer training and thus the age limit of wage-earning also increases. The pedagogists must strive to find the amount of strain, physical and mental, which may be placed on accelerated and retarded, city and country children. If such factors are neglected, the resultant tensions may cause severe trauma in the soul of the young people. Juvenile delinquency is a problem of ever growing importance throughout the world. According to BENNHOLDT—THOMSEN [1] most of the boy-criminals are retarded in their development and are unable to meet the social requirements and circumstances of their age group. In the case of girls retarded and too much accelerated ones occur in about equal proportions among the juvenile delinquents; the social-ethical burden seems to be placed on the two extremes. The acuteness of the problem makes it essential to describe scientifically the phenomenon of puberty acceleration, to expose its causes, and to come to know more about its consequences. All these may help us later in our effort favourably to influence the development of human personality.

#### LITERATURE

1. BENNHOLDT—THOMSEN, C. (1952) Über das Accelerationsproblem. *Z. menschl. Vererb.- u. Konstitutionslehre.*, **30**, 619—634.
2. DAHLBERG, G. (1942) Methodik zur Unterscheidung von Erblichkeits- und Milieuvariationen mit Hilfe von Zwillingen. *Hereditas*, **28**, 409—428.
3. DAHLBERG, G. (1943) Mathematische Erblichkeitsanalyse von Populationen. Uppsala, Almqvist & Wiksell.
4. EIBEN, O. (1958) Adatok a körmendi ifjúság testfejlődéséhez. On the bodily development of the youth of Körmend. *Anthr. Közl.*, **2**, 43—55. (In Hungarian.)
5. ELLIS, W. B. (1950) Age of puberty in the tropics. *Brit. Med. J.*, (1), 85—94.
6. FEKETE, S. (1955) A serdülés kora. Age of puberty. In ZOLTÁN, I. Nőgyógyászat (Gynaecology) Művelt Nép. Budapest. 34—36. (In Hungarian.)
7. FINNEY, D. J. (1952) Probit Analysis. Cambridge, Univ. Press.
8. FRIGYESI, J. (1943) Nőgyógyászat. Gynaecology. Budapest Magyar Orvosi Könyvkiadó. (In Hungarian.)
9. HOGBEN, H., WATERHOUSE, J. A. H., HOGBEN, L. (1948) Studies on puberty. Part I. *Brit. J. soc. Med.* **2**, 29—42.
10. JANKOVICH, A. (no date) A nemi érés (menstruatio) időpontjának öröklése ikerkutatás alapján. Heritability of sexual maturation (menstruation) on the basis of twin studies. In DARÁNYI, Gy. Az ikrek testi és lelki tulajdonságai. Physical and psychical properties of twins. Egyetemi Nyomda, Budapest. 239—246. (In Hungarian.)
11. KRALJ—ČERČEK, L. (1956) The influence of food, body build and social origin on the age at menarche. *Human Biol.*, **28**, 393—406.
12. LERNER, I. M. (1958) The genetic basis of selection. William Sonn. New York—London.

13. MICHELSON, N. (1944) Studies in the physical development of Negroes. IV. Onset of puberty. *Am. J. Phys. Anthr.*, **2**, 151—166.
14. MILLOT, J. (1952) Biologie des races humaines. Paris, Armand Colin.
15. PETRI, E. (1935) Untersuchungen zur Erbbedingtheit der Menarche. *Z. Morph. Anthr.*, **33**, 43—48.
16. PORTMANN, A. (1944) Biologische Fragmente zu einer Lehre des Menschen. Basel, Benno Schwabe.
17. ŠKERLJ, B. (1927) Le début de la menstruation et la pigmentation. *Anthropologie (Prague)*, **5**, 267—270.
18. ŠKERLJ, B. (1932) Menarche und Klima in Europa. *Z. Ethnol.*, **63**, 413—414.
19. ŠKERLJ, B. (1937) Zum Problem: Menarche—Rasse—Umwelt. *Die Mediz. Welt* 1082—1084, 1119—1121.
20. ŠKERLJ, B. (1947) Menarha in prehrana. *Zdravn. Vestn.*, **16**, 55—60.
21. STERN, C. (1950) Principles of Human Genetics. Freeman & Co., San Francisco.
22. VÉLI GY. (1956) Újabb tanulmány a tanuló ifjúság testi fejlődéséről. New studies on the physical development of school-aged youth. *Biol. Közl.*, **3**, 97—113. (In Hungarian.)
23. WADDINGTON, C. H. (1957) The strategy of the genes. Allen & Unwin, London.

#### MENARCHEALTER, ACCELERATION UND HERITABILITÄT

Mit Hilfe der Probit-Analyse wurde das mediane Menarchealter 414 Budapest Schulmädchen auf  $12,75 \pm 0,08$  Jahre geschätzt. Dieser Befund zeigt, im Vergleich mit älteren und neueren Angaben des In- und Auslandes, eine bedeutende Akzeleration der Pubertät. Gestützt auf Heritabilitätschätzungen vertritt der Verfasser — übereinstimmend mit PORTMANN — den Standpunkt, daß die Akzeleration der Pubertät neben peristatischen Faktoren von einem mit der Urbanisation zusammenhängenden Selektionsprozeß verursacht wird.

ANDOR THOMA, Budapest VI. Bajza u. 39. Hungary.

# RUHEZUSTAND BEI DEN PROTOZOEN MITTELS METAMORPHOSE

KATALIN KORMOS

ZYTOGENETISCHES LABORATORIUM, SZEGED (VORSTAND: J. KORMOS)

(Eingegangen am 20. April, 1960)

## Zusammenfassung

Es ist gelungen, außer den Podophryen auch in den Genera *Acineta* und *Metacineta* einen Enzystierungstyp festzustellen, der durch die Metamorphose des Schwärmers verwirklicht wird. Diese Enzystierung stellt einen separaten Ruhezyklus dar, der — dem trophischen Lebenszyklus ähnlich — sich aus dem Nacheinander zweier Phasen (Schwärmerbildung und Metamorphose) und zweier Stadien (larvales und Zysten-Stadium) entwickelt. Der Exzytierung geht immer eine Schwärmerbildung innerhalb der Zyste voran, und zwar dem Zellteilungstyp gemäß, der der Vermehrung des trophischen Zustandes entspricht.

Die mit Metamorphose verbundene Zystenbildung ist keine atavistische Erscheinung, sondern eine neue Fähigkeit der sessilen Suctorien. Die Erklärung dafür ist, daß die Induktion der Enzystierung auf die Phase der Schwärmerbildung vorverlegt wurde.

Obwohl der trophische und der Ruhezyklus sich voneinander unabhängig, ja sogar entgegengesetzt variieren, kann der Ruhezyklus in phylogenetischer Beziehung als wichtige Anleitung dienen. So liefert er innerhalb der Familie Ophryodendridae einen entscheidenden Beweis für die verwandschaftliche Verbindung der Genera *Parapodophrya*, *Thecacineta*, *Tachyblaston*, *Spelaeophrya*, *Ophryodendron*.

In drei Familien ist die durch die Metamorphose des Schwärmers entstehende Dauerzyste bereits bekannt (Podophyridae, Acinetidae, Ophryodendridae). Von den übrigen drei Familien, bei denen noch kein Ruhezyklus bekannt ist, können viele Arten der Discophryiden in trophischem Stadium die Austrocknung sogar besser vertragen, als die Dauerzyste selbst.

## Einleitung

Es ist seit langem bekannt, daß viele Protozoen auf gewisse Einwirkungen der Umgebung mit Enzystierung reagieren. Vor der Enzystierung runden sich der Körper allmählich ab, seine kortikalen Organe werden reduziert, endlich werden sie meistens völlig resorbiert. Während dieser Veränderung scheidet die Körperfläche einen Umhüllungsstoff aus, der oft aus mehreren Schichten besteht und sich zu einer Zyste von charakteristischer Struktur entwickelt. Im allgemeinen ist es auch charakteristisch, daß die kortikalen Organe sich reorganisieren, ehe die Hülle zu verlassen, und nachdem sie die völlige Bewegungsfähigkeit wiedererlangt haben, dringt das Protozoon an irgendeiner Stelle der Hülle hervor.

Erst bei den Podophryen fiel es auf, daß die Enzystierung auch nach einem anderen Typ vor sich gehen kann. Es wurde lange darüber gestritten, wie die Enzystierung von *P. fixa* und *P. libera* vonstatten geht. Da die erste Phase der Umwandlung unmittelbar nicht bekannt war, bestand das Problem

darin, ob der ursprüngliche Stiel sich in den Stiel der Zyste verwandelt, oder aber das Tier vor der Enzystierung einen neuen Stiel entwickelt. Seitdem ist die Streitfrage entschieden worden: es stellte sich nämlich heraus, daß die *Podophrya* nicht in entwickeltem, trophischem Stadium, sondern nur in Schwärmerzustand der Enzystierung fähig ist und die Zystenbildung sich immer während einer regelmäßigen Metamorphose abspielt. Im Übergangszustand stellt sie ein mit Hülle, Stiel und Saugrörchen versehenes Tier dar, in dem Maße aber, wie die Entwicklung der Hülle immer mehr nach oben weitergeht, ziehen sich die Saugrörchen in den Körper zurück und schließlich kann auch der obere Teil der Zyste sich verschließen.

Diese Enzystierung schien eine ausschließliche Fähigkeit der *Podophrya* zu sein, weil in der Literatur keine Angabe gefunden werden konnte, die auf eine ähnliche Umwandlung schließen ließe. Ende des Herbstes 1958 lieferte die in der Tisza durchgeführte Sammlung ein Ergebnis, das das Wiederaufwerfen der Frage und die Fortsetzung der Untersuchung auf Grund der neuen Erfahrungen sowohl in morphogenetischer, als auch in phylogenetischer Richtung der Mühe wert macht.

#### Die Enzystierung der *Podophrya hungarica* n. sp.

Diese Art der Podophryen wird seit langem in Kultur gehalten. In einigen Worten sollen hier — im Vergleich mit den anderen *Podophrya*-Arten — seine unterscheidenden Merkmale erwähnt werden. Von geringeren Unterschieden abgesehen, bilden die Scopula, der Stiel, die Struktur der Zyste und die Auswahl der Nahrung die wichtigsten Merkmale in der Unterscheidung der vier Arten.

*P. fixa* — der Schwärmer ist mit Scopula versehen; das entwickelte Tier ist bestielt; die Nahrung bilden Hypotrichen; die Zyste hat 5 Rippen.

*P. libera* — der Schwärmer ist mit Scopula versehen; das entwickelte Tier ist bestielt; die Nahrung bilden Hypotrichen; die Zyste hat 8—16 Rippen.

*P. parasitica* — der Schwärmer hat keine Scopula; das entwickelte Tier ist stiellos; die Nahrung ist *Nassula*; die Zyste hat 5 Rippen.

*P. hungarica* — der Schwärmer hat keine Scopula; das entwickelte Tier ist stiellos; die Nahrung ist *Paramecium*; die Zyste hat 10—13 Rippen.

METSCHNIKOFF [1, 2] führt einen der Parasiten von *Paramecium* unter dem Namen *Sphaerophrya sol*, MAUPAS unter dem Namen *Sph. parameciorum* an [1, 2, 10]. Keine der Beschreibungen genügt, um die seit langem angeführten Arten mit der *P. hungarica* zu identifizieren. GUILCHER [6] erwähnt auch

eine am *Paramecium* schmarotzende *Podophrya*, und zwar unter dem Namen *P. parasitica parameciae*. Ohne genaue Angaben erwähnt er, daß sie sich von der *P. parasitica nassulae* in der Zahl der Rippen der Zyste unterscheidet.

Die zystenbildenden Schwärmer der *Podophrya*-Arten stimmen auch darin überein, daß alle vier eine Scopula besitzen, und zwar an einer ähnlichen Stelle, an dem mit der Vakuole identischen Rande, im hinteren Drittel des Körpers.

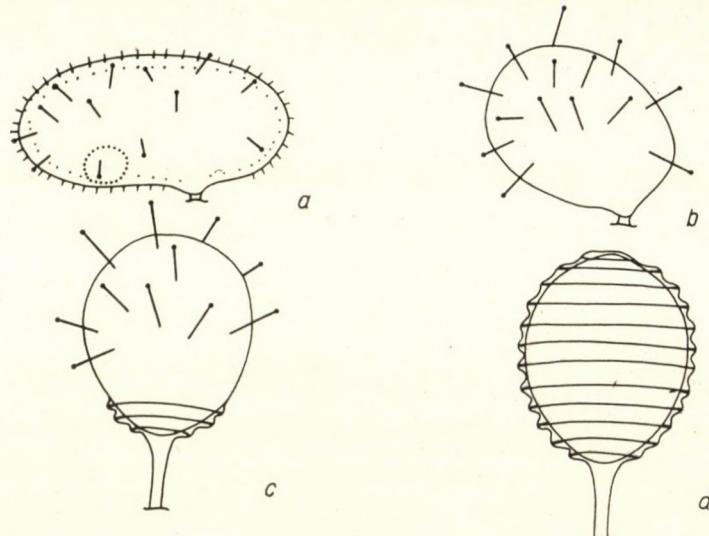


Abb. 1. Zystenbildung bei *Podophrya hungarica*

Abb. 1 zeigt einige Einzelheiten der Enzystierung der *P. hungarica*. Der Schwärmer wendet sich mit der Scopula auf dieselbe Weise der Unterlage zu, wie vor der Entwicklung des trophischen Stadiums. Nach Anhaftung erstarrt die Bewegung der Zilien, und der Körper fängt an, sich abzurunden. Gleichzeitig werden die Zilien allmählich resorbiert, und auf der Fläche innerhalb des Ziliengürtels wachsen überall die Saugrörchen heran. Gleich nach der Anhaftung kann auch das langsame Wachstum des Stiels beobachtet werden. Der Stiel ist schon bei seiner Base breiter, als der Stiel des trophischen Zustandes der bestielten Podophryen (*P. fixa* und *P. libera*) und er breitet sich um ein wenig über der Anhaftungsfläche stufenweise aus. Der Stiel der Zyste hat auch bei der *P. fixa* und *P. libera* denselben Charakter, der Stiel des trophischen Stadiums ist dagegen bei beiden Arten um das Mehrfache länger und von einer gleichmäßigen Dicke. Der Stiel des trophischen Stadiums ist überall schmäler, als der unterste, schmalste Teil des Stiels der Zyste.

Ehe der Stiel der Zyste seine volle Länge erreicht hätte, erscheint die erste Kreisfalte der zukünftigen Zystenhülle, die sich stufenweise erhebend sich von der Körperfläche trennt. Von da an geht die Hüllbildung unter

der Erhebung immer neuerer und neuerer Falten in der Richtung der Spitze weiter, bis sie diese erreicht und die Zyste sich auf der der Spitze zugewendeten Seite verschließt. Die Saugröhren ziehen sich in dem Maße zurück, wie die Hülle nach oben rückt.

Die *P. hungarica* nimmt während der Enzystierung ebenso keine Nahrung auf, wie die *P. parasitica*. Zu dieser Zeit wird sie von *Paramecium* umsonst berührt, das Saugröhren haftet nicht an. Die in Enzystierung begriffenen Schwärmer sind beinahe immer reichlich mit Nahrungskörnchen gefüllt. 1–2 Tage nach der Erfrischung des Kulturwassers dringt das Tier aus der Zyste wieder hinaus. Vorhergehend entwickelt es, sich von der Zyste zurückziehend, seine Ziliatur. In einer kleineren Zyste entsteht nur ein Schwärmer, in einer größeren Zyste auch mehrere. Die Schwärmer schlüpfen durch die sich an der Spitze der Zyste befindende, offenbar weniger verschlossene Öffnung ins Freie hinaus. Der freigewordene Schwärmer ist gleich imstande, ein neues *Paramecium* zu ergreifen. FAURÉ-FREMIET [4] beobachtete bei der *P. parasitica*, daß der aus der Zyste herausschlüpfende Schwärmer sich wieder enzystiert. Innerhalb der Zyste wurde von ihm keine Vermehrung beobachtet. Bei Gelegenheit bildet der herausschlüpfende Schwärmer der *P. hungarica* auch eine Zyste, aber auch das enzystierte Tier vermehrt sich, wie es bei allen anderen *Podophrya*-Arten der Fall ist.

### Die Zyste der *Metacineta mystacina*

In der Tisza lebt eine Varietät der *Metacineta mystacina*, die einen sehr langen Stiel besitzt. Ende des Herbstes 1958 fand ich immer öfter — gleichzeitig mit der Abnahme der Zahl der Metacineten — an der Unterlage haftende, flache Zysten, auf deren oberen Teil sich ungefähr 4–5 radiale Rippen erhöhen. Die Rippen laufen oft einem Dach ähnlich aufeinander zu (Abb. 2). Das Innere der Zyste ist meistens mit Nahrungskörnchen überfüllt und außer der Vakuole ist auch der Makronucleus gut erkennbar. Gleichzeitig lebten in der Gesellschaft der *Metacineta* *Heliophryen* und *Dendrosomen* mit *Acineta papillifera* und *A. fluviatilis* zusammen. Ausnahmsweise fand ich auch Zysten, die einen sehr kurzen Stiel haben, übrigens aber ähnlich sind. Die Zyste haftet der Unterlage an, es ist aber gelungen, sie mit einer Nadelspitze vorsichtig so weg-zurücken, daß sie nicht verletzt wurde. Abgesondert und in einem Wassertropfen bedeckt, platzten die Zysten an ihrem oberen Teil manchmal schon am nächsten Tag auf: ich fand in dem Wassertropfen einen sich bewegenden Schwärmer, oder eine neulich verwandelte *Metacineta* mit einem sehr langen Stiel. Was den Umriß anbelangt, stimmt der Schwärmer mit abgeflachtem Körper mit dem schon früher beobachteten Schwärmer der *Metacineta* überein, der aus Knospung stammt. Die ausführliche Struktur seiner Ziliatur und beson-

ders diejenige der ventralen Fläche konnte ich bis jetzt noch nicht untersuchen; er unterscheidet sich aber von den normalen vegetativen Schwärmern nicht, da er sich während der Metamorphose zu einer langstieligen *Metacineta* entwickelte. Die einzige Erklärung für den auffallenden Unterschied zwischen dem Ruhezustand (Zyste) und dem trophischen Stadium kann nur der Unterschied zwischen den Schwärmern sein, die die Zyste und das trophische Stadium bilden. Dieser Unterschied ist hier noch größer als bei den Podophryen. Der zystenbildende Schwärmer haftet mit seiner ganzen ventralen Fläche an der Unterlage, der andere hingegen nur mit seiner Scopula. Es ist wahrscheinlich, daß bei dem vorhergenannten die Scopula fehlt. Der strukturelle Unterschied zwischen den beiden Schwärmern ist bei der *Metacineta* gerade von entgegengesetztem Charakter, wie z. B. bei der *P. hungarica*. Bei dem einen ist die Zyste stiellos, bei dem anderen ist es die trophische Gestalt, die keinen Stiel besitzt.

Aus der Zyste dringt oft nach der Zweiteilung zuerst der eine, dann der andere Schwärmer heraus. Nach dem Herausdringen finden wir in der Hülle meistens einen kleineren oder größeren Plasmenrest (Abb. 2).

### Die Zyste der *Acineta papillifera* und der *A. fluviatilis*

Die ersterwähnte Art kommt in der Tisza auch oft vor, aber wegen ihrer Variabilität und hauptsächlich deswegen, weil die »Papille« an dem Begegnungsort der Hülle und des Stiels nicht immer gleichermaßen entwickelt ist, muß es wieder untersucht werden, wie sie sich zu der typischen Art verhält. Die zweite Art kommt beinahe immer mit der *A. papillifera* vor.

Im Herbst, zur gleichen Zeit (Oktober—November), als ich die *Metacineta* samt den beiden Acineten untersuchte, zeigten sich in immer zunehmender Zahl kurzstielige Zysten in zweierlei Größenordnungen ( $60 \times 75 \mu$  und  $35 \times 45 \mu$ ). Als die Zysten und die aus der Zyste herausschlüpfenden Schwärmer abge-

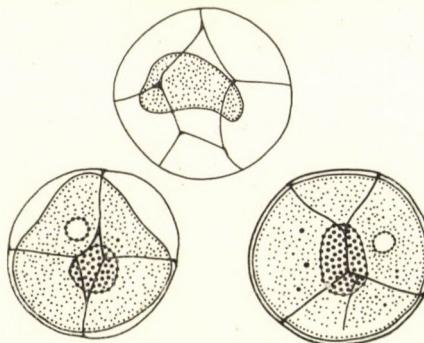


Abb. 2. Zysten von *Metacineta mystacina*

sondert wurden, gelang es festzustellen, daß sie beide in der Tat die Ruhestadien der beiden *Acineta*-Arten darstellen. Die aus der Zyste herausschlüpfenden Schwärmer stimmen auch hier mit denjenigen überein, die aus gewöhnlicher Knospung stammen, und zwar sowohl in der Struktur der Ziliatur, als auch in dem Vorhandensein der hinteren Haftscopula. Die Zysten sind beinahe immer mit Reservekörnchen vollgestopft, sie sind nicht durchsichtig. Ihre Form ist der Hülle der entwickelten Tiere ähnlich. Ihr kurzer Stiel befestigt sich mittels einer Haftplatte an der Unterlage. Der Stiel der Zyste ist viel breiter und viel kürzer als der des trophischen Tieres (ungefähr ein Siebentel oder Achtel derselben). Die Scopula des zystenbildenden Schwärmers der beiden Acineten ist breit, aber weniger aktiv, deshalb entwickelt sie einen breiten und kurzen Stiel. Die Hüllenbildung der Acineten geht in der Richtung von unten nach oben vor sich, ebenso wie die der *Podophrya*, wir können aber höchstens eine sehr schwache Querzeichnung beobachten, Rippen werden nicht gebildet. Der zystenbildende Schwärmer muß während der Metamorphose vorübergehend auch die beiden Saugröhrenbündel entwickeln, weil sonst die Form der Zystenhülle derjenigen der Zyste des trophischen Tieres nicht dermaßen ähnlich sein könnte. Obwohl ich keine Gelegenheit hatte, die Einzystierung selbst zu verfolgen, steht es außer Zweifel, daß die Hülle der Zyste der Acineten stufenweise, von unten nach oben rückend, Zustand kommt, ebenso wie die der Podophryen. Die flache Zyste der *Metacineta* verschließt sich gleichfalls stufenweise, im Gegensatz zur überragenden Mehrzahl der Protozoen, die die Hülle der Zyste gleichzeitig und ohne Metamorphose ausscheiden.

Die Acineten können aus ihrer Zyste nur in Schwärmergestalt herausdringen. Die mit Reservekörnchen gefüllten Zysten enthalten genügend Material zur Entwicklung von zwei oder drei Schwärmern und es entwickeln sich in ihnen in der Tat 2–3 Schwärmer nacheinander. Diese Entwicklung stimmt völlig mit dem allometrischen Typ der circumvaginativen Knospung überein, wodurch die normale Vermehrung beider Arten charakterisiert wird.

Vor der Schwärmerbildung geht in der Zyste eine kolloidale Zustandsveränderung vor sich. Diese äußert sich in zwei auffallenden Erscheinungen. Zuerst verändert sich die Lichtbrechung des Plasmas, es wird opalisierend. Wahrscheinlich beginnt die Aufarbeitung der Reservekörnchen. Später schwelt der Inhalt der Zyste stark an, der obere Rand der Hülle schließt sich auf und durch die geöffnete Ritze, die jetzt schon einen geringeren Widerstand leistet, erhebt sich das mit einer dünnen Pellikulenschicht bedeckte Plasma. Einmal gelang es die Anschwellung des oberen Randes der Zyste vom Anfang bis zum Ende zu beobachten. Sie ging in 15 Minuten, an einem Pol beginnend und sich bis zum anderen Pol ausdehnend, vor sich. Wahrscheinlich kann die Anschwellung auf dem ganzen oberen Teil auch gleichzeitig vorstatten gehen. Diese Anschwellung geht der Schwärmerbildung voran und eröffnet für das Herausdringen des Schwärmers den oberen Rand der Zyste. Über die Entwicklung

des Schwärmers werden nur zwei Bilder angeführt, die zur Charakterisierung des Typs genügen (Abb. 2). Der entwickelte Schwärmer dringt in der Nähe des einen Poles der Zyste auf die gewöhnliche Weise heraus.

### Der Ruhezyklus der Suctorianen

Die Untersuchung des Ruhezyklus kann noch viele neue Ergebnisse liefern, es lohnt sich aber schon, die bisherigen Resultate zusammenzufassen.

Der Ruhezyklus kann mit dem trophischen Lebenszyklus in eine Parallelie gestellt werden. Er spielt sich im Nacheinander zweier Phasen und zweier Stadien ab: 1. *Die Phase der Schwärmerbildung*. Die Schwärmerbildung, als Zellteilungstyp, stimmt bei den beiden überein. Bei den Podophryen entwickeln sich die zweierlei Schwärmer mit heteromorpher Zellteilung, bei den Acineten mit circumvaginativer Knospung. 2. *Der Schwärmerzustand*. Zwischen den zweierlei Schwärmern besteht ein, je nach Kategorien veränderlicher, aber bestimmter Unterschied. Der Unterschied ist in der Struktur und in dem Funktionieren der Scopula am auffallendsten. Dieser Unterschied kann je nach Gruppen einen entgegengesetzten Charakter haben; der Unterschied tritt am schärfsten bei den stiellosen Podophryen und bei den bestielten Metacineten zum Vorschein. Die vorigen entwickeln eine bestielte Zyste, die letzteren eine völlig stiellose Zyste. 3. *Die Phase der Metamorphose* ist nur den Unterschieden im Organismus der Schwärmer entsprechend verschieden. Der Unterschied äußert sich hauptsächlich in der Verankerung im Substrat, in der Länge und Dicke des Stiels. Die Hüllensbildung geht von unten nach oben allmählich weiter, bis sie sich auch an dem oberen Teil verschließt. 4. *Der Ruhezustand* ergibt eine neue Schwärmerbildung, die beinahe immer von Vermehrung begleitet wird. Vor der Schwärmerbildung schwellt die Zyste an. Das Tier kann aus der Zyste nur in Schwärmerform freikommen. Der neue Schwärmer entsteht immer gemäß dem für die Art charakteristischen Zellteilungstyp. Die Schwärmerbildung beginnt auch innerhalb der Zyste dort, wo bei dem trophischen Individuum; auch die Stelle, wo der Schwärmer herausdringt, entspricht jenem.

Der Ruhezyklus endet damit, daß der aus der Zyste herausschlüpfende neue Schwärmer sich zu einer trophischen Gestalt entwickelt. Es kommt jedoch vor, daß in der Zyste wieder ein zystenbildender Schwärmer zustande kommt und die Zystenbildung sich wiederholt.

### Die Verbreitung des Ruhezustandes und die Zystentypen

Bei der *Podophrya*, *Acineta* und *Metacineta* entwickelt sich der Ruhezustand mittels Metamorphose. Auf Grund der Struktur der Zyste könnte man auch bei den Genera *Sphaerophrya* und *Paradophrya* auf dasselbe folgern. In der

früheren Literatur finden wir kein ähnliches Beispiel, aber die kurze Bemerkung von FILIPJEV in bezug auf die *Tokophrya* ist bemerkenswert. Demnach bildet die *T. quadripartita*, an ihrem ursprünglichen Stiel verharrend, eine runde Zyste, der Schwärmer ist aber imstande sich zuenzystieren. Über die Enzystierung des Schwärmers kann man sich in Ermangelung näherer Angaben kein klares Bild verschaffen und aus der Rundheit und Stiellosigkeit der Zyste kann man keinesfalls auf eine Metamorphose, sondern nur auf einfache Hülleausscheidung schließen. Jedenfalls ist eine neue Untersuchung nötig.

Obwohl COLLIN die diesbezügliche Bemerkung von PROWAZEK [2] auf eine verschiedene Weise erklärt, kann auch die Zyste der *A. tuberosa* der Zyste der Arten *A. fluviatilis* und *A. papillifera* ähnlich sein.

GRELLS Beschreibung [5], die das *Tachyblaston* betrifft, in Erwägung ziehend, steht es außer Zweifel, daß der Zustand, der als Stadium »Dactylophrya« bezeichnet wird, der sich mittels Metamorphose entwickelnden Zyste der *Podophrya*, *Acineta* und *Metacineta* entspricht. GRELL schreibt unter dem Namen Amphigenesis über zwei vegetative Generationen. Es ist aber leicht, den Generationswechsel des Tachyblastons auf eine richtige und allgemeingültige Weise zu deuten, und zwar auf Grund der folgenden Parallele: Das Stadium »Dactylophrya« besitzt eine Hülle mit offenem Rand und entspricht dem Zystenzustand der erwähnten Suctorien. Dieser Zystenzustand entwickelt sich aus der Metamorphose des bewimperten Schwärmers. In der Zyste, als in einer Hülle mit offenem Rand, bilden sich zilienlose, vermiforme Schwärmer in der Richtung der unverschlossenen Öffnung, und zwar durch kombinierte Zellteilung, die mit derselben des bewimperten Schwärmers identisch ist. Aus der Metamorphose des zilienlosen Schwärmers entwickelt sich das trophische Stadium. Ebenso wie im Beispiel der *Podophrya*, *Metacineta* und *Acineta*, ist der zystenbildende Schwärmer und die Zyste selbst mit Reservekörnchen reichlich gefüllt und ist imstande — sogar ohne Nahrungsaufnahme — viele Schwärmer zustande zu bringen. Der Unterschied zwischen dem trophischen und dem Zystenstadium (»Dactylophrya«) entspricht dem Unterschied zwischen der trophischen Gestalt und der bestielten Zyste der stiellosen Podophryen. Der Unterschied in der Ziliatur der beiden Schwärmer ist auch nicht überraschend. Er hat gleichfalls einen Mutationswert, wie der zilienlose Schwärmer der *D. collini* oder der zilienlose Schwärmer der Ophryodendriden. Aus den Gesagten ist es offensichtlich, daß die zweierlei Schwärmer und die beiden entwickelten Stadien des Tachyblastons mit den entsprechenden larvalen und entwickelten Stadien der *Acineta*, *Metacineta* und *Podophrya* übereinstimmen.

Nach COLLIN [2] und gemäß unseren heutigen Kenntnissen bildet sich die temporäre gelatinöse Hülle bei den Ephelotiden und Discophryiden unmittelbar aus der Sekretionstätigkeit des entwickelten Tieres. Die Enzystierung der Dendrocometiden ist nicht bekannt. Wir wissen nicht, ob in diesen drei

Familien eine Dauerzyste vorhanden ist und es gibt kein Zeichen, das auf eine sich durch Metamorphose entwickelnde Zyste hinwiese.

Außer der temporären, gelatinösen Zyste und der wirklichen Dauerzyste kann noch mit einem dritten Zystentyp gerechnet werden, und zwar mit der Konjugationszyste. Diesbezüglich stehen uns nur zwei, in wesentlichen Einzelheiten mangelhafte, Daten zur Verfügung [2]. Mehrere Male beobachtete ich Metacineten-Paare, deren Plasmakörper nach der Vereinigung sich in einer gemeinsamen, mit dicker Kutikula versehenen Hülle befand. Eine solche Zyste mag auch die von PENARD beobachtete Zyste sein, und die als abnorme Knos-

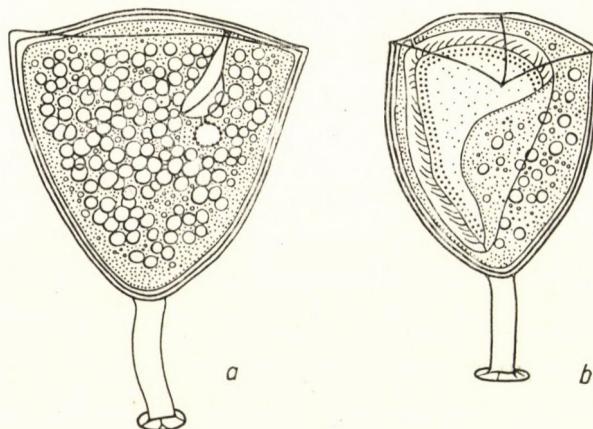


Abb. 3. Zysten von *Acineta papillifera*

pung dargestellte Beobachtung nichts anderes, als Konjugation. ([15] Abb. 51, 8—9.) Über die Entwicklung dieses Zystentyps werden wir hoffentlich später berichten können.

Von den dreierlei Zysten, die bei den Suctorien bekannt sind, kommen zwei in den meisten Gruppen der Protozoen vor. Die dritte aber, die aus Metamorphose stammt, ist bis jetzt anderswo nicht vorgekommen. Nach unseren heutigen Kenntnissen ist die Gruppe der Peritrichen die einzige, bei der mit einem zum Teil ähnlichen Enzystierungstyp — als konvergenter Zug — gerechnet werden kann. Diese Konvergenz besitzt einen sehr beschränkten Wert, da die Peritrichen nicht nur im Schwärmerzustand, sondern auch in entwickeltem Zustand bewimperte Protozoen sind. Frühere Angaben [1] erwähnen, daß einige Peritrichen vor der Enzystierung sich in Schwärmer verwandeln, der Schwärmer siedelt an, entwickelt einen kurzen Stiel und erst nachher scheidet er die Zystenhülle aus. Dies ist von der durch völlige Metamorphose begleiteten Umwandlung der Suctorien weit entfernt, der der Enzystierung vorangehende Schwärmezustand und die der Hüllenausscheidung vorangehende Stielbildung stellen jedoch ähnliche Züge dar.

## Die phylogenetische Wertung der Zystenbildung

Die temporäre, gelatinöse Zyste und die runde kutikulare Zyste, die bisher nur in Verbindung mit der Konjugation beobachtet wurde, ist auch im Kreise der übrigen — tierischen und pflanzlichen — Protisten sehr verbreitet. In einer phylogenetischen Erwägung können sie keine besondere Rolle spielen. Die Dauerzyste aber, die aus dem Auftreten und aus der Metamorphose von speziellen Schwärfern resultiert, stellt ein wirkliches phylogenetisches Rätsel dar, sowohl in ihrem primären Ursprung, als auch in ihrer Beziehung zum trophischen Stadium, ferner darin, daß sie — gemäß unseren heutigen Kenntnissen — nur in gewissen systematischen Kategorien erscheint.

Bei der Gruppe *Podophrya*—*Sphaerophrya*, dem einfachsten Vertreter der Suctorien, wird die Dauerzyste mittels Metamorphose hergestellt. Heute ist in der nächsten Ziliatenverwandtschaft eine ähnliche Zyste nicht bekannt, deshalb steht die Frage offen, ob die Podophryen diese Fähigkeit auf der Suctorien-Stufe sich verschafften, oder aber von ihren Vorfahren geerbt haben.

FAURÉ-FREMIET [4] bezeichnet die sich enzytierende, noch mit Saugrörchen versehene Form der *P. parasitica* als »Paracineta«-Stadium. Die Ähnlichkeit ist aber keine Wesensähnlichkeit; die Paracineten sind keine *Podophrya*-Vorfahren, sondern differenzierte Abkömmlinge einer andersgerichteten Entwicklung. Dies wird auch durch ihre invaginative Knospung bewiesen [12]. Wird die mit Metamorphose verbundene Zystenbildung als Atavismus betrachtet, so müßten die schmalen, langstielen, hüllenlosen Podophryen von breiten und kurzstielen Vorfahren abgeleitet werden, deren Hülle Querrippen aufweist. Dies ist zwar vorstellbar, diese Vorstellung ist aber durch nichts erhärtet. Wir kennen keinen solchen »Vorfahr«, der im trophischen Zustand mit einer Hülle leben würde, die derjenigen der *Podophrya*-Zyste ähnlich ist, und sich gleichzeitig mit einem Schwärmer von *Podophrya*-Typ und mittels Knospung vermehren würde. Einen solchen zu suchen hieße müßige Vermutungen anzustellen.

Anstatt nach »Vorfahren« zu forschen, ist es richtiger, diese Erscheinung folgendermaßen zu erklären: die Enzytierung, die pellikulare oder kutikulare Hüllenausscheidung ist eine uralte Fähigkeit der Ziliaten- und Suctorienzellen. Die Enzytierung ist bei den Protozoen mit dem entwickelten Stadium verbunden. Die Enzytierung wird immer durch eine entsprechende spezifische Einwirkung hervorgerufen, genau so wie die Schwärmerbildung. Die Protozoen-Zelle reagiert auf die eine induktive Einwirkung mit Schwärmerbildung, auf die andere mit Enzytierung. Diese Reaktionsfähigkeit konnte ursprünglich nur gesondert zur Geltung kommen. Die Enzytierung und die Schwärmerentwicklung sind nämlich entgegengesetzte morphogenetische Veränderungen, die im allgemeinen unter dem Einfluß verschiedener Einwirkungen auftreten. Die Reaktionsfähigkeit des Organismus kann sich aber derart

modifizieren, daß unter dem Einfluß einer und derselben Einwirkung beide morphogenetischen Prozesse induziert und durchgeführt werden. Der eine stellt die Knospung und die weitere Differenzierung des mittels Knospung entstandenen Schwärmers, der andere die Enzystierung und die mit der Enzystierung Hand in Hand gehende Reduzierung des Organismus dar. Der Schwärmer wird durch die entsprechende Einwirkung bereits zur Zeit der Knospung zur Enzystierung determiniert. Es ist verständlich, daß solange die Knospung dauert, der Drang nach Enzystierung unmittelbar nicht zur Geltung kommen kann. Indirekt ist er aber schon dann wirksam, und zwar nicht nur auf eine determinative Weise, sondern auch so, daß er den Organismus modifiziert. Dies wird durch den Organisationsunterschied zwischen dem Schwärmer des Ruhezyklus und dem Schwärmer des trophischen Lebenszyklus bewiesen. Während im ersten Teil der Ontogenese die Enzystierungsinduktion indirekt wirksam ist, tritt sie im zweiten Teil der Ontogenese auch unmittelbar auf. In der Metamorphose sind schon zwei morphogenetische Bestrebungen neben einander wirksam: die der Weiterentwicklung, die aus dem Schwärmer ein, mit Saugröhren versehenes, aktives trophisches Stadium entwickeln würde und die der Enzystierung, die ein passives Zystenstadium ohne Saugröhren bilden würde. Das simultane Vorhandensein der zweierlei Wirkungen führt dazu, daß die Saugröhren zwar vorübergehend erscheinen, aber auch dann inaktiv sind, und sich schließlich völlig zurückziehen. Was die Intensität und die Vollständigkeit der Umhüllung betrifft, erreicht die anfängliche Hüllenbildung endlich die Stufe der Enzystierung. Der Einfluß der Reduzierung, der am Anfang schwächer ist, überwindet schließlich völlig den Einfluß der Differenzierung, die Induktion des passiven Ruhezustandes besiegt den aktiven trophischen Zustand. Obwohl die Wirkung zweier entgegengesetzten Einflüsse anderswo nicht so eng miteinander verbunden ist, wie in der Metamorphose des Schwärmers, sind zahlreiche Beispiele dafür bekannt, daß die Induktion der Enzystierung und der Zellteilung miteinander in Beziehung stehen. Viele Protozoen bilden zuerst eine Zyste und vermehren sich unmittelbar nachher. Anderswo knüpft sich die Kopulation oder die Autogamie an die Enzystierung an.

Nicht nur in der Enzystierung, sondern auch in anderen Lebensäußerungen sind Beispiele dafür bekannt, daß die Determination einer Veränderung in die Phase des Schwärmers, bzw. der Schwärmerbildung, verschoben wird, die determinierte Veränderung aber sich erst nach oder während der Metamorphose des Schwärmers aktualisiert. So wird die Geschlechtsdetermination der isogamen Konjugation im Falle von Anisogamie in die Phase der Schwärmerbildung des Mikrokonjuganten verschoben. Auch hier geht die Phasenverschiebung der Determination mit der Mutationsveränderung des Schwärmers Hand in Hand. Der vegetative (trophische) Schwärmer und der Geschlechtschwärmer unterscheiden sich in ähnlicher Größenordnung, wie der trophische

und der zystenbildende Schwärmer. Die Herausbildung des Lebenszyklus ist gerade die Folge des Umstandes, daß die Determination der einzelnen physiologischen Akte sich von dem entwickelten Zustand in den larvalen Zustand verschiebt.

Auf Grund der oben Gesagten besteht kein Grund dazu, die mittels Metamorphose vor sich gehende Enzystierung als eine phylogenetische Veränderung zu erwägen, die bis zu den Ziliaten-Vorfahren zurückgeht. Dies aber bedeutet nicht, daß sie keine phylogenetische Wichtigkeit hat. Wenn z. B. die stiellose *Podophrya*- oder *Sphaerophrya*-Art eine bestielte Zyste zu bilden imstande ist, dann kann man mit Recht auf die ursprüngliche stielbildende Fähigkeit der vegetativen Form gefolgert werden. Die Entwicklung des Ruhezyklus leistet manchmal auch in der Beurteilung von entfernten phylogenetischen Verbindungen eine bedeutende Hilfe. Der Fall von *Thecacineta* und *Tachyblaston* liefert ein schönes Beispiel dafür. Wenn wir z. B. die trophischen Stadien von *Thecacineta* und *Tachyblaston* und die vorhergehenden Schwärmer vergleichen, dann kommen wir kaum auf den Gedanken der Verwandtschaft der beiden Genera, der Unterschied zwischen ihnen ist so bedeutend [5, 11]. Wenn wir aber auch den Ruhezyklus bei *Tachyblaston* beobachten, dann ist die Verwandtschaft des bewimperten Schwärmers, der das Ruhestadium herausbildet, mit dem trophischen Schwärmerzustand von *Thecacineta* offenbar!

Es ist äußerst interessant, daß der zilienlose Schwärmer der trophischen Gestalt von *Thecacineta* eine wesentliche Übereinstimmung mit dem ähnlichen, vermiciformen Schwärmer von *Ophryodendron* aufweist. So bestätigt sich nun in jeder Hinsicht die Verwandtschaft und die Zugehörigkeit zu derselben Familie von drei Genera, die in drei verschiedene Familien eingereiht und neulich für drei verschiedene Familien gehalten wurden [5, 11]. Darauf wurde bereits an anderer Stelle hingewiesen.

Trophischer Lebenszyklus, Ruhezyklus, Geschlechtszyklus: alle drei besitzen einen Schwärmer für sich und die Möglichkeit der unabhängigen Veränderung des Schwärmers. Eben deshalb ist es verständlich, daß die entgegengesetzte gerichtete Veränderung auch vorkommt, als z. B. der zystenbildende Schwärmer seine stielbildende Fähigkeit verliert, der Schwärmer der trophischen Gestalt hingegen dieselbe bewahrt. Diese unabhängige Veränderlichkeit mahnt zur Vorsicht in der phylogenetischer Erwägung. Gleichzeitig gibt sie Gelegenheit auch dazu, die langumstrittenen zweierlei Schwärmer der Ophryodendriden zu erwähnen [1, 2, 6]. Solange neue, ausführliche Untersuchungen nicht zur Verfügung stehen, kann man auch nicht wissen, was die Wahrheit ist. Die Ergebnisse der Untersuchungen in bezug auf die Lebenszyklen erwägen aber diese Frage nicht mehr als ein besonderes Problem, sondern als eine, den übrigen Möglichkeiten ähnliche Möglichkeit. In jedem Lebenszyklus kann ein Schwärmer verschiedenen Typs auftreten, der in der Scopula, in der Ziliatur usw. Abweichungen aufweist, es wäre daher überhaupt nicht überraschend,

wenn bei dem *Ophryodendron* zwei Lebenszyklen und dementsprechend ein bewimperter und ein ziliensloser Schwärmer gefunden würden.

Die Entwicklung der Lebenszyklen kann noch einen sehr wichtigen phylogenetischen Wertanzeiger haben. Heute ist bei drei Familien ein Ruhezyklus, ein mit Metamorphose verbundener Zystenzustand bekannt, bei drei Familien kennen wir solche nicht. Es ist leicht möglich, daß es endgültig bestätigt wird: sein Auftreten ist auch für Familien charakteristisch. Für Genera ist es zweifelsohne kennzeichnend. So beweist es nicht nur die gemeinsame Anstammung der Familien und der Genera und die von den übrigen abweichende phylogenetische Richtung derselben, sondern es liefert einen kategorisierenden Wertmesser von entscheidender Wichtigkeit.

### Der ökologische Wert des Ruhezustandes

Der ökologische Wert der gelatinösen, temporären Hülle ist sehr gering. Die ökologische Rolle der häutigen Dauerzyste in dieser Verbreitung und in der Erhaltung nach der Austrocknung wird in der Literatur reichlich erwägt. Die Feststellungen beziehen sich »im allgemeinen« auch hierauf. Hier ist aber ein anderes, wichtigeres Maß auch vorhanden. Hier wirft sich nicht nur die Frage auf, inwiefern der Zystenzustand zur Ertragung der Unbilden geeigneter ist als der trophische Zustand, sondern auch die Frage danach, ob es eine einfachere und sicherere Methode zur Ertragung der Trockenheit und zur Steigerung der Verbreitung gibt, als die Enzystierung. Sollte eine solche nirgends vorhanden sein, bei den Suctorien gibt es eine. Darauf wurde zuerst von DRAGESCO, BLANC-BRUDE, GAUCHERY in einem Beispiel [3] in Verbindung mit der Anhydrobiose der *Cyclophrya magna* (*Heliophrya erhardi*) hingewiesen. Seitdem gelang es nicht nur von einer anderen *Cyclophrya*-Art festzustellen [9], daß sie zur Ertragung der schnellen Austrocknung eine außerordentliche Fähigkeit besitzt. Durch Untersuchung vieler Suctorien gelang es verschiedene Abstufungen in der Austrocknungstoleranz ohne unmittelbare Enzystierung nachzuweisen [13]. Die Cyclophryen haben einen außerordentlich abgeflachten Körper, aber die konvergenten Formen einer anderen Familie sind nicht imstande, die Austrocknung zu ertragen (*Heliophrya*, *Lernaeophrya*). Die Acinetiden dulden die Austrocknung kaum, oder überhaupt nicht. Mit den Zysten der *Acineta papillifera* und der *A. fluviatilis* wurde bisher nur eine Vorprobe durchgeführt. Nach eintägiger Austrocknung sind die wenigen, der Probe unterworfenen Zysten zugrunde gegangen! Es ist wahrscheinlich, daß die Trockenheitstoleranz der Zyste — mindestens in geringem Maße — immer größer ist, als die des trophischen Zustandes, die Zysten der Acinetiden erreichen nicht einmal annäherungsweise die enzystierungslose Anhydrobiose der einzelnen Discophryidengruppen, was die Ertragung der Austrocknung anbelangt! Auch

innerhalb der Discophryiden sind viele Abstufungen vorhanden. Die *D. astaci* kann z. B. nicht einmal eine kurze Eintrocknung ertragen. Die Discophryen mit abgeflachtem Körper sind schon zäher. Die ökologische Beziehung ist ziemlich einfach: die *D. astaci* lebt auf Krebsen, die Discophryen mit abgeflachtem Körper leben auf Käfern, die von Zeit zu Zeit aus dem Wasser herausfliegen. Die unmittelbare Eintrocknung wird jedoch nicht von den symphorinontischen Discophryen am längsten ertragen, sondern von der *Caracatharina* und der *Cyclophrya*, die auf dem Grund oder auf der Haut der Flüsse und Stillwasser ansiedeln. Die Vertreter dieser beiden Genera ertragen auf die Dauer sowohl die schnellste als auch die dauerhafte Eintrocknung.

In einzelnen Gruppen der Suctorianen gibt die Enzystierung einen relativ größeren Schutz gegen die Eintrocknung, als das trophische Stadium, sie erreicht aber nicht einmal annäherungsweise die Widerstandsfähigkeit, welche andere Glieder der Discophryiden ohne Enzystierung erreichten. Nach unseren jetzigen Kenntnissen ist dies eine alleinstehende Fähigkeit in der Welt der Protozoen.

Die Enzystierung kann durch vielerlei Einwirkungen hervorgerufen werden. Hierher gehört auch die Abkühlung des Wassers, weil die meisten *Acineta-* und *Metacineta*-Zysten gerade im Herbst gefunden wurden. Die Zyste der Suctorianen dient auch der Vermehrung, da die Zysten beinahe immer mit Reservekörnchen gefüllt und zu Schwärmerbildung geeignet sind. Die Rolle der wohlgenährten Zysten besteht primär nicht im Schutz vor der Trockenheit, sondern jedenfalls in der Ertragung der Unbilden.

#### LITERATUR

1. BüTSCHLI, O. (1889) Protozoa. I. In BRONN Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs. Leipzig.
2. COLLIN, B. (1912) Étude monographique sur les Acinétiens. II. *Arch. Zool. gen. expér.*, **51**, 1—475.
3. DRAGESCO, J. R., BLANC-BRUDE, R., GAUCHERY, M. (1956) Anhydrobiose chez un infusoire tentaculifère: *Heliophrya erhardi* (RIEDER) MATTHES. *Mikroskopie*, **10**, 262—266.
4. FAURÉ-FREMIET, E. (1945) *Podophrya parasitica* nov. sp., *Biol. Bull.*, **79**, 85—97.
5. GRELL, K. (1950) Der Generationswechsel der parasitischen Suktors Tachyblaston ephelotensis MARTIN, *Z. Parasitenk.*, **14**, 499—534.
6. GUILCHER, Y. (1951) Contribution à l'étude des Ciliés gemmipares. Chonotriches et Tentaculifères. *Ann. Sc. Nat. (Zool.)*, **13**, 33—132.
7. KENT, S. (1882) Manuel of the Infusoria II. London.
8. KORMOS, J. (1958) Phylogenetische Untersuchungen an Suctorianen. *Acta Biol. Hung.*, **9**, 9—23.
9. KORMOS, J. (1958) Experimentelle Untersuchung des Knospungsgradienten. *Acta Biol. Hung.*, **9**, 105—129.
10. KORMOS, J., KORMOS, K. (1958) Determination in der Entwicklung der Suctorianen. II. Neue Untersuchungen über den determinativen Zusammenhang zwischen der Schwärmerbildung und der Metamorphose. *Acta Biol. Hung.*, **9**, 25—45.
11. KORMOS, J., KORMOS, K. (1957) Die entwicklungsgeschichtlichen Grundlagen des Systems der Suctorianen I. *Acta Zool. Hung.*, **3**, 147—162.
12. KORMOS, K. (1960) The formation of the swarmer of *Parapodophrya* and its relationship. *J. Protozool.*, **7**, Suppl. 22.

13. KORMOS, K. (1960) Unveröffentlichte Untersuchungen.
14. MATTHES, D. (1956) *Thecacinetia calix* (SCHRÖDER 1907) Thecacinetidae nov. fam. und ihre Fortpflanzung durch Vermoid-Schwärmer. *Arch. Protistenk.* **101**, 477—528.
15. PENARD, E. (1929) Études sur les Infusoires Tentaculifères. *Mém. Soc. Phys. Hist. Nat. Genève*. **39**, 131—229.

### СОСТОЯНИЕ ПОКОЯ ПУТЕМ МЕТАМОРФОЗА У ПРОСТЕЙШИХ

Кроме *Podophrya* также и в родах *Acineta* и *Metacineta* удалось установить такой тип инцистирования, который осуществляется путем метаморфоза бродяжек. Это инцистирование представляет собой особый цикл покоя, состоящий, подобно трофическому жизненному циклу, из последовательности двух фаз (образование бродяжек и метаморфоз) и двух стадий (личиночная и цистозная стадии). Выходу из цисты всегда предшествует образование бродяжек внутри цисты, согласно типу деления клеток, соответствующему размножению в трофической стадии.

Связанное с метаморфозом образование цисты не представляет атавистического явления, а является новой способностью сидячих *Suctoriae*, возникшее благодаря тому, что индукция инцистирования продвинулась вперед в фазу образования бродяжек.

Несмотря на то, что трофический цикл и цикл покоя варьируют независимо друг от друга, даже в противоположном направлении, последний цикл все же может служить важным указанием в филогенетическом отношении. Цикл покоя появляется в родах различных семейств также конвергентно, однако, в пределах семейства *Ophryodendryidae* он предоставляет важное доказательство родственных связей между родами *Parapodophrya*, *Thecacinetia*, *Tachyblaston*, *Spelaeophrya*, *Ophryodendron*.

Стойкая циста предоставляет более или менее надежную защиту против высыхания. Хотя нам в трех семействах еще неизвестно образования стойких цист, все же среди них весьма многие виды рода *Discophryidae* в трофической стадии также длительное время способны переносить высыхание. Быть может эта бесподобная способность возмещает отсутствие стадии цисты.

### RESTING STATE OF PROTOZOA WITH METAMORPHOSIS

In addition to the *Podophrya*, it has been possible to ascertain a type of encystment also in the genera *Acineta* and *Metacineta* which is produced by a metamorphosis of the larvae. This encystment constitutes a separate resting state which similarly to the trophic state is composed of two successive phases (production of larvae and metamorphosis) and two successive stages (larval and cystic). Encystment is always preceded by the intracystic production of larvae according to the type of cell division which corresponds to multiplication of the trophic stage.

Production of cysts associated with metamorphosis is no atavistic phenomenon but a new character of sessile *Suctoriae* which is brought about by a forward displacement of the induction of encystment to the phase of production of larvae.

Although the trophic and resting phases may vary separately and in an opposite sense, the latter may nevertheless furnish an important clue from a phylogenetic point of view. The resting condition of quiescence is converging in the genera of various families but, within the family of the *Ophryodendryidae*, it, nevertheless, furnishes a proof in favour of a close genetic affinity between the genera *Parapodophrya*, *Tecacineta*, *Tachyblaston*, *Spelaeophrya* and *Ophryodendron*.

Durable cysts offer more or less protection against desiccation. They are still unknown in three families but one of them, viz. that of the *Discophryidae*, has numerous species which are able to withstand desiccation even in the trophic stage for a long time. This unique ability may compensate for the absence of the cystic stage.

KATALIN KORMOS, Szeged, Aradi vértanuk tere 1. Ungarn.



# A COMPARATIVE STUDY OF THE SPONTANEOUS ACTIVITY OF THE WHITE RAT AND THE BROWN OR WHARF RAT

M. KURCZ

INSTITUTE OF GENERAL ZOOLOGY, EÖTVÖS LORÁND UNIVERSITY, BUDAPEST (HEAD: G. MÖDLINGER)

(Received June 10, 1960)

## Summary

The spontaneous activities of the white rat and the brown or wharf rat were compared with the aid of actograph-registration under various environmental conditions. It has been established that the white rat has an activity of the polyphasic type while the wharf rat a monophasic one. The activity period of the brown rat is longer and the rest period is shorter as compared with the white rat.

The spontaneous activity of the white rat is to a large extent influenced by the length of starvation and the time of feeding, this applies considerably less to the brown rat. An essential increase of the length of the spontaneous activity caused under the influence of starvation can be observed in the white rat while the activity of brown rat is scarcely affected. The course of the spontaneous activity of white rat is altered by changes in the time of feeding and tending, while the activity of brown rat is not influenced.

The periodic alternation of light and darkness exerts a critical effect on the movement of the animals but this effect is stronger on brown rats than on white rats. The spontaneous activity of wharf rat is altered by the reversal of light and darkness as soon as in 4 days, while in the case of white rat this takes 10 to 15 days. The motoric activity is decreased by both permanent light and permanent darkness; in the case of brown rat even the character of this activity is changed.

Relying upon the results obtained the author draws some conclusions with reference to the development and influence of the biorhythm.

## Introduction

The spontaneous activity of the animals as a process of interest and importance has attracted also on account of inferences that may be drawn from its changes, the attention of many research workers. Most investigations were made on the members of the order of Rodentia probably because the major part of the laboratory test animals generally used are belonging to this order.

The diurnal rhythm of the white mouse was examined in full details by ASCHOFF [3, 4, 5]. According to his very noteworthy results every animal has an intrinsic periodicity which under constant circumstances remains unchanged and even can be transmitted by inheritance to the next generation. The own frequency (*Eigenfrequenz*) of the individuals becomes synchronized by the time indicators (*Zeitgeber*) of the environment. A correlation was established between the spontaneous activity, some vegetative functions and even the activity of the endocrine glands by BÄNDER [7]. On the other hand SHCHER-BAKOVA [26] found no correlation between the diurnal cycle of the activity, the frequency of respiration and the periodicity of the body temperature.

The spontaneous activity of non-domesticated mice has been examined by KALABUHOV [cit. 26]. SHCHERBAKOVA [27] reports on a rather marked two phase motoric activity in *Apodemus agrarius*. FILATOVA [15] found that the diurnal activity of *M. musculus* is rather high and distributed uniformly over the 24 hours of the day. OSTERMAN [25] also examined the diurnal and seasonal rhythm of the spontaneous activity on wild animals (*Microtus arvalis*, *Ap. sylvaticus*, *Ap. flavicollis*, etc.). BROWN [12] described the diurnal and seasonal rhythm of *Ap. sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus* and *Microtus agrestis* native to England. DURUP [14] made observations on the rhythm of the activity of *Microtus arvalis*. MÖDLINGER and co-workers [23] found the spontaneous activity of white mouse kept under standard conditions having two phases. They described a long activity period from 18 to 3 o'clock and a short one from 6 to 8 o'clock. Locomotoric activity and oxygen consumption were demonstrated to be in agreement.

The study of the spontaneous activity of the rat was begun by SLONAKER [27, 29]. SZYMANSKI [31, 33] ascertained in his classical experiments, conducted as soon as about 1918 evolving for the first time an objective method of movement registration that the white rat is an animal of the "polyphasic" rhythm type and found ten distinguishable periods during 24 hours which were more or less in conformity with each other.

A considerable number of the reports is concerned with the factors influencing the diurnal rhythm of the spontaneous activity. RICHTER [cit. 24] feeding the animals every 2 hours, observed that the locomotoric activity tends to become more lively when the time of feeding approaches. The influence of temperature, food and lack of water upon the spontaneous activity was analyzed by STEVENSON and RIXON [30]. BROWMANN [8, 10] suggested that light and temperature are the most important influencing factors. He states that the eye is a principal organ exercising its function probably through the hypophysis. Also JORES [18] is of the opinion that the hypophysis is the connecting link between light and diurnal rhythm. According to LEVINSON and co-workers [21], however, hypophysectomy scarcely influences the spontaneous activity of the white rat. Investigations were carried out also about the effect of other endocrine glands on the spontaneous activity. JORES [18] and LEVINSON [21] have demonstrated a 24 hour fluctuation of the melanophore hormone of the hypophysis in the blood of rats. BROWN and co-workers [11] do not consider the theory which tries to explain the rather regular periods with the periodic activity of the endocrine system as satisfactory. A correlation has been demonstrated, similarly to other animals and even plants, between the lunar periodicity and the spontaneous activity of the rat.

The number of data available concerning rats living in freedom is considerably lower. The motoric activity of these has an explicit nocturnal character. Monophasic activities of this type were found in *Rattus norvegicus*, *R. rattus*

and *R. rattus alexandrinus* [22]. Recently BARNETT [6] has dealt with the behaviour of rats living in freedom without giving any data concerning spontaneous activity.

A careful study of the publications of these and other authors reveals besides many contradictory findings a substantial and concordant difference between the domesticated and non-domesticated forms of the same species as to the match of spontaneous activity. Therefore it seemed important to study the factors likely to be responsible for the difference between the motoric activities of the wild and domesticated species, the rhythm of the spontaneous activity being in the last analysis under the control of these factors.

Since the origin of the white mouse is not clear enough yet, it was found safer to conduct researches on the brown or Norway rat (*Rattus norvegicus* BERKENHOUTE) and the white rat (*R. norvegicus* var. *albino*), because the origin of these can be regarded as elucidated.

### Method

Investigations were carried out on 12 brown rats and on 15 seven months old white rats weighing 180—200 grams and bred in this Institute. Only male animals were included in the experiments because a correlation had been established by several authors [28, 34] between the spontaneous activity and the oestrous cycle. The age of the brown rats included in the experiments was of course unknown. Animals 180—200 grams in weight were used in the experiments. The animals were caught in the basement of the Institute building without having been injured and were taken under observation 20—25 days later. Motion was registered by the aid of an actograph of the author's own construction and the actograms were fixed by a kymograph on paper blackened with soot. On the actogram the distance related to one hour was regulable at will. Rotational velocity was adjusted in a way that movements recurring per 20 minutes already yielded lines that could be isolated. About 800 actograms have been prepared in this way under various experimental conditions.

Evaluation of the actograms involved no difficulties because the periods of activities and rest are well separated in the actogram as is seen on Fig. 1. Thus measuring the activity period could be carried out with great precision. Serious difficulties arose, however, when comparing the intensities of activity. According to OSTERMANN [25] this is even impossible. A method for the simultaneous measurement of length and intensity of activity was evolved by the author [20]. Labour required for these measurements, however, is in no reasonable proportion to the result that can be obtained. The room where the experiments took place could be completely darkened and the outdoor noises practically excluded. Temperature (20° C) and humidity were kept constant in the room during the whole experimental period irrespective of the outside conditions (relative humidity 48 per cent). The animals were fed with a standard coarse meal mixed to a pulp with as much water that the animals according to our experience [19] did not need extra water to drink.

### The effect of feeding

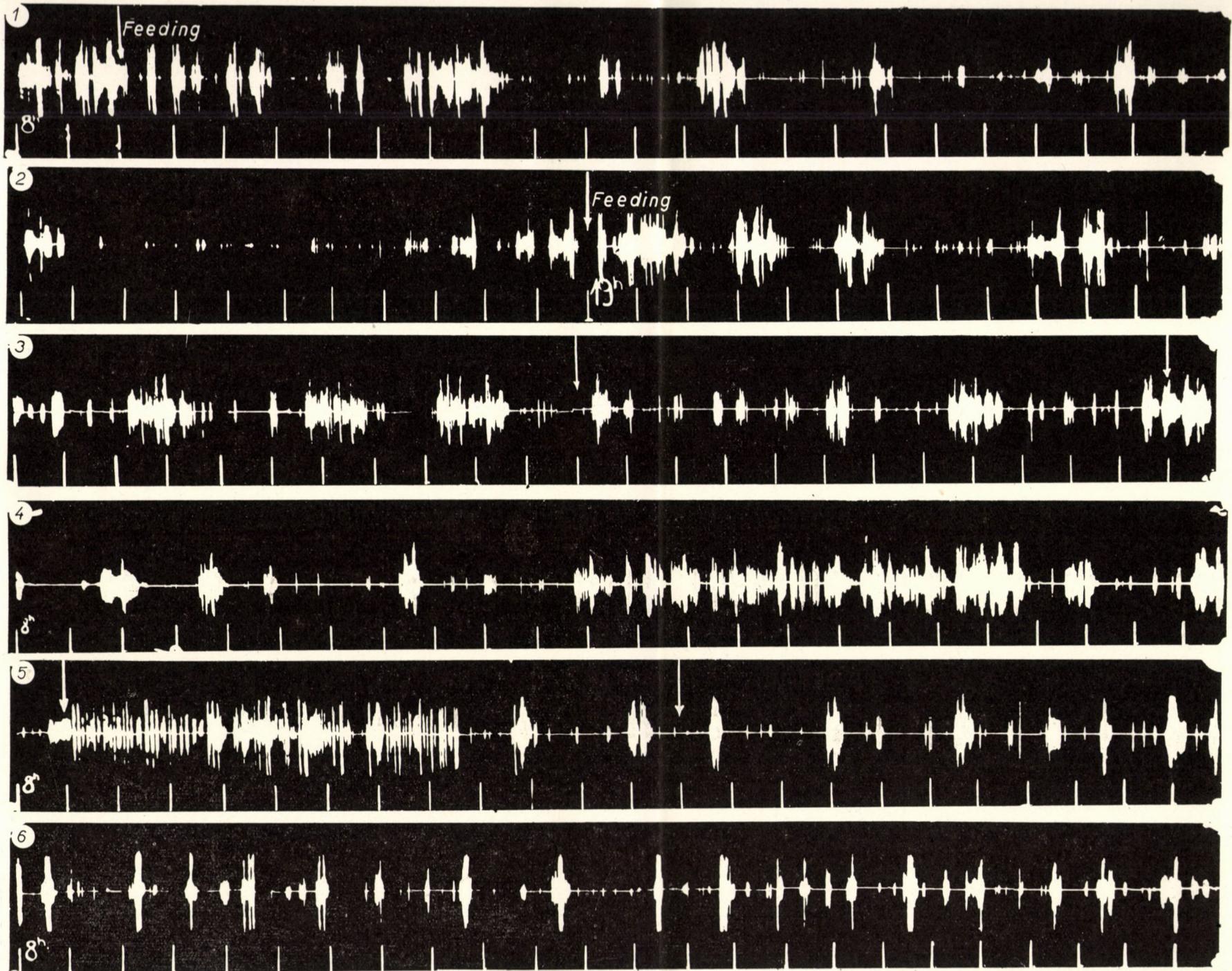
#### *White rat*

The actograms of the white rats kept under ordinary laboratory conditions suggested that the animals have really a rhythm of the polyphasic type (Fig. 1). During the 24 hours of the day several activity periods are observable, none of which is dominant, and they are separated by rest periods. Ana-

lysis of these actograms also suggests that the activity of white rat is not distributed uniformly over the 24 hours of the day, since more than 60 per cent of the total activity occurs during the period from 8 to 20 o'clock and only about 35,7 per cent in the period from 20 to 8 o'clock. The activity is very intensive mainly at about 9 o'clock. About at this time were the animals fed, according to working hours. Fed at forenoon the animals seemed to exhibit a "day-time" activity. If the time of feeding was in the evening, other conditions unchanged, there was a shift in the activity already after 5 to 10 days (Fig. 2). In this case 63,3 per cent of the activity occurs in the night and only 36,7 per cent in day-time, the animals being transformed to evening or night activity animals.

Immediately the question arises, to what extent this is the effect of starving since it has been observed that starving very explicitly influences the spontaneous activity of mice. The phase of moving becomes lengthened and activity periods are grouped around the accustomed feeding time. After 48 hours starvation the motoric movement of the animals increases by 47 per cent, *i. e.* it reaches a value one and a half times as high. It might be expected that perhaps a short time after feeding there is no more fodder left. Indeed if this is the case, the spontaneous activity of white mouse is directed by feeding. This conclusion is supported by the findings of HALBERG and co-workers [16] from a quite different side. They have established that in white mouse the 24 hours fluctuation of the number of eosinophile cells in case of starving or unsatisfactory amount of food given is depending on the feeding. The spontaneous activity is in a much more intimate connection with the feeding and, therefore it is to be presumed that the change of the number of the eosinophile cells is the effect of the movement activity manifesting itself come through mechanism of other kind, though different opinions can be encountered in this respect [1, 2]. During our experiments particular attention was paid to avoid starving of the animals and food was so proportioned out that at least a quarter of it remained in the cage until the time of next feeding. The phenomenon, however, may be explained also in this case by similar reasons. Animals prefer fresh food. Later on food becomes desiccated, fermented, contaminated and the animals even scatter the dry fodder all over the place.

So a conditioned reflex can develop in the animals, irrespective of our intention, upon the time of eating and tending and would appear day by day regularly even if the animal does not explicitly suffer from hunger. This observation is of great importance, for it calls the attention to the fact that even laboratory animals cannot be made independent from the environment. In experiments of longer duration this must be given special consideration. From Table 1 it is clear that the amount of total activity is 8 hours and 1 minute if animals are fed in the morning while it is higher, lasting for 8 hours and 55 minutes, in the case of evening feeding. This latter stands nearer to the



Figs. 1—6. The actograms of the white rat and brown rat.

Each actogram records the result of the observation of one animal for 24 hours. The period from 8 to 8 o'clock next morning is registered per hours on each of the actograms by vertical lines. — 1. The polyphasic activity of white rat under laboratory conditions. Fed between 9 and 10 o'clock. Natural light conditions. — 2. The polyphasic activity of white rat under laboratory conditions. Fed between 18 and 19 o'clock. Natural light conditions. — 3. Typical polyphasic activity of the white rat after the effect of feeding had been excluded. Illumination from 19 to 7 o'clock. — 4. The typical monophasic activity of the brown rat 20 to 25 days after having been caught. Fed at about 9 o'clock. Natural light conditions. Illumination from 7 to 8 until 18 to 10 o'clock approx. — 5. The reversal of the spontaneous activity in the brown rat caused by the change of the time of feeding. Fed at about 9 o'clock. Illumination from 21 to 9 o'clock. — 6. Transformation of the monophasic activity of the brown rat into an activity of the polyphasic type in the case of protracted illumination



brown rat's longer activity. We are, therefore, of the opinion that for tending the white rats evening time is appropriate.

**Table 1**  
*Comparison of the length of the motoric period*

	Length of activity during 24 hours	
	Brown rat	White rat
Feeding in the morning .....	11 <sup>h</sup> 25' s = ±55.7	8 <sup>h</sup> 1' s = ±46.7
Feeding in the evening .....	11 <sup>h</sup> 35' s = ±50.3	8 <sup>h</sup> 55' s = ±37.1
Starving for 48 hours .....	11 <sup>h</sup> 56'	13 <sup>h</sup> 10'
Permanent light .....	9 <sup>h</sup> 52' s = 27.4	7 <sup>h</sup> 53' s = ±33.4
Permanent darkness .....	10 <sup>h</sup> 50' s = ±63.0	6 <sup>h</sup> 50' s = ±57.8

Subsequently it was presumed that this effect of feeding can be suspended, excluded if fodder of sufficient quantity and of standard quality is available during the whole day. As a matter of fact we were able to create such conditions. The best method is, of course, when a noiseless automatic device is employed, which continuously exchanges the food in a way non-perceptible for the animal. As to the white rats its is sufficient to supply more feeding-troughs and larger quantity of food at an undefined period of the day.

### Brown rat

The actograms for the brown rat show a characteristic activity of the monophasic type (Fig. 4). Compared to any of the white rat actograms the difference is striking. The motoric activity occurs at night with a dominant period and lasts from 20—21 to 4—5 o'clock depending on the length of illumination. In day time it is followed by a longer rest period which is interrupted every 2 to 2.5 hours by activity period of 10 to 20 minutes with almost full regularity. Probably this is in relationship with the feeding and evacuation of the animals. The time period of the activity is longer than in the white rat: 11 hours and 30 minutes on an average as against 8 hours 30 minutes for the white rats. These results were obtained as the mean value of many hundred measurements and the difference is statistically reliable. It may be assumed that under natural conditions the period of motoric activity is still longer. Also this conclusion gained from the measurement of spontaneous activity is an evidence of the fact that domestication actually goes with a reduction of the irritation of the nervous system.

Changes of the hour of feeding have no effect in the case of the brown rat. The "nocturnal" character of the animals remains unchanged irrespective

of the feeding. Starving for 48 hours, by which so strong a response-reaction is brought about in white rats is also without any effect.

“Proximity of man” is, on the other hand, of a great importance in this period. This factor is almost negligible in white rats and its influence if any, is the opposite of what is observed in the brown rat, since the brown rat in captivity practically does not perform motoric activity at all in the presence of man. Moreover the day-time “proximity of man” exercises its influence even on the night behaviour of the animals as shown by MAYZELIS and RUTTENBURG [22].

### The effect of light and darkness

#### *White rat*

Subsequently the effect of the periodic alternation of light and darkness was taken under examination under constant conditions of temperature and feeding. After the exclusion of the feeding factor the activity of the white rat was of the polyphasic type with a nocturnal character. If night and day are inverted by administering at night the diffuse light of two 150 W lamps and completely darkening the room during the day the rhythm will slowly turn within 10 to 15 days. Now more than 60 per cent of the activity will occur in the dark period of 12 hours corresponding to the original day-time while only 40 per cent occurs in the 12 hours illuminated (Fig. 3). Consequently light and darkness are deeply influencing the diurnal rhythm of the spontaneous activity if other important factors are not disturbing.

The question whether light or darkness is the controlling factor remains, however, to be answered. For this purpose the animals were kept for a longer period in protracted darkness or in a constantly lighted room, respectively. The effect on the animals of being constantly kept in darkness is recorded in Fig. 8. The animals have been for almost 30 days in complete darkness. Their 24 hours activity as compared with the results obtained for control animals decreased continuously as far as the 10th to 12th day, to remain constant at this level. In Table 1 this decrease is shown numerically the daily movement being about 20 minutes less. By applying the “*t*” test to the results the difference proves to be significant ( $P < 0,05$ ). The distribution of the motoric activity measured in the original sections of the day is also changed. The difference imposed by the alternation of light and darkness becomes rather indistinct. If the 24 hours are divided into four arbitrarily chosen periods (*e. g.* 20<sup>h</sup>—2<sup>h</sup>—8<sup>h</sup>—14<sup>h</sup> or 23<sup>h</sup>—5<sup>h</sup>—11<sup>h</sup>—17<sup>h</sup>) the distribution of the activity will approach the values of 25—25—25—25 per cent.

The diurnal activity is reduced also under the influence of permanent light (Fig. 7). The rate of this reduction is presented in Table 1. By using the

"*t*" test the difference proves to be significant. The diurnal distribution of activity also becomes disturbed. The sections of the day no more govern the spontaneous activity and the activity periods now are distributed uniformly.

The answer to the question raised above seems to be very surprising. The motoric activity is diminished both by permanent darkness and protracted light, so the inference may be drawn that neither light nor darkness but the periodic alternation of the two conditions is the decisive factor. This, as a change of the environment, has a stimulating effect on the eye as receptor of the organism and indirectly increasing the irritation of the nervous system and raises the motoric activity of the animal. In complete darkness one of the

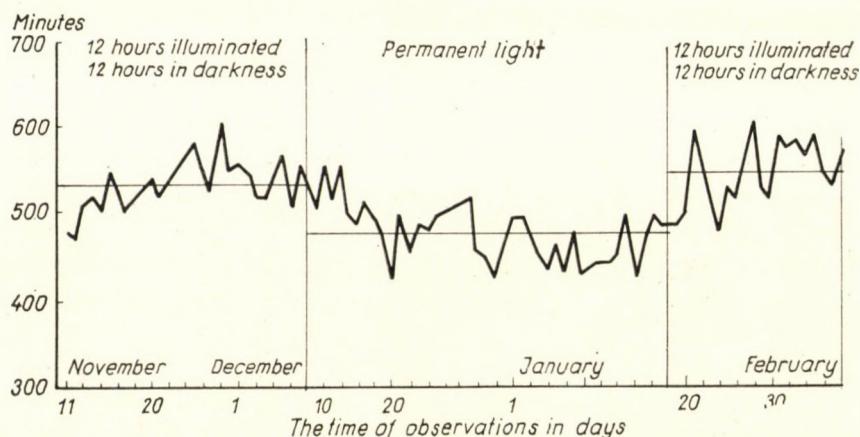


Fig. 7. Significant reduction in the length of activity of white rat in permanent light. Ordinate — total diurnal activity in minutes, abscisse — time in days. The curve records the daily fluctuation of the period of motoric activity. Straight lines mark the averages of the length of motoric activity during the days of the experiment

receptors of the organism through which impulses could arrive at the central nervous system is practically eliminated. As a consequence, in the author's opinion, the excitation of the whole central nervous system is reduced.

Our results discussed are apparently at variance with the findings of SZYMANSKI [32] who observed in complete darkness an increase of the length of activity and of the number of separable periods. The divergency may be traced back to the fact that he has not observed the motoric activity in constant darkness for a longer period but simply generalized the results obtained during 24 hours after darkening. Our observations agree, however, with BROWMANN's [9] data who reports on a slow decrease of the spontaneous activity in blind rats.

*Brown rat*

As mentioned before and as shown in Fig. 4 brown rat exhibits a monophasic nocturnal activity under usual laboratory conditions. If night and day are reversed in the above described way, the diurnal rhythm of the spontaneous activity in brown rats will be changed in a surprisingly short time, in no more than 4 days. During the dark period corresponding to the original day-time the animal is active while it is in rest in the 12 hours of illuminations. No changes were observed in the intensity of activity and in the number of separable activity period (Fig. 5).

Light and darkness thus have a more considerable effect upon the brown than on the white rat. This is strikingly demonstrated by the experiment in

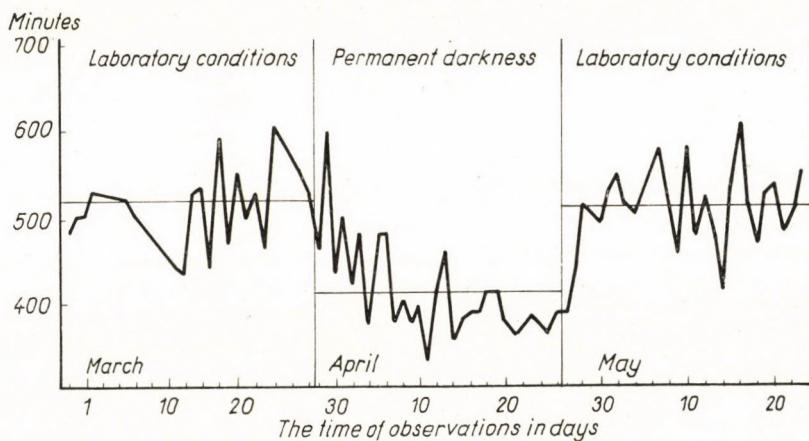


Fig. 8. Significant reduction in the length of the activity of white rat in permanent darkness. For further explanation see Fig. 7

which permanent illumination was administered. Under the influence of protracted illumination the animal of monophasic type becomes a typical polyphasic one. This change occurs rapidly. The change in the character of the spontaneous activity is presented in Fig. 6. The process takes place rapidly also in the opposite direction for the animal replaced under normal conditions shows a monophasic activity again in 6 to 8 days. Amount of activity compared to the alternation of light and darkness shows a total daily decrease of 90 minutes, the difference being significant. In spite of this decrease the activity in brown rat is still higher than that of the white rat (Fig. 9).

In protracted darkness changes do not occur so rapidly. The brown rat maintains for a fairly long time (for 10 to 14 days) the rhythm developed before the effect of lasting darkness. The length of activity is reduced, but this reduction only lasts for 40 minutes and, therefore, cannot be statistically evaluated (Fig. 10).

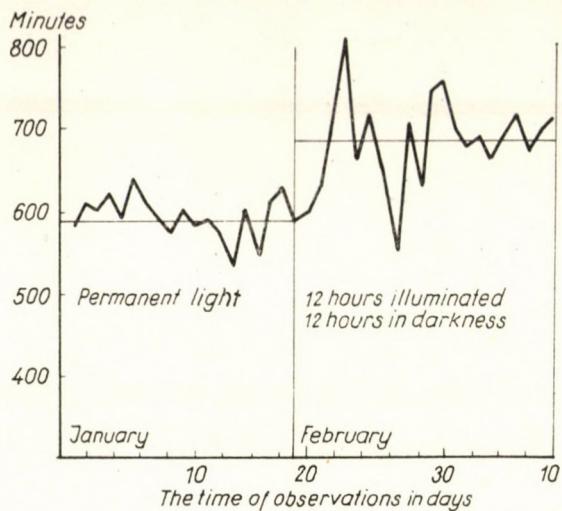


Fig. 9. Significant reduction in the length of the activity of brown rat in permanent light. For further explanation see Fig. 7

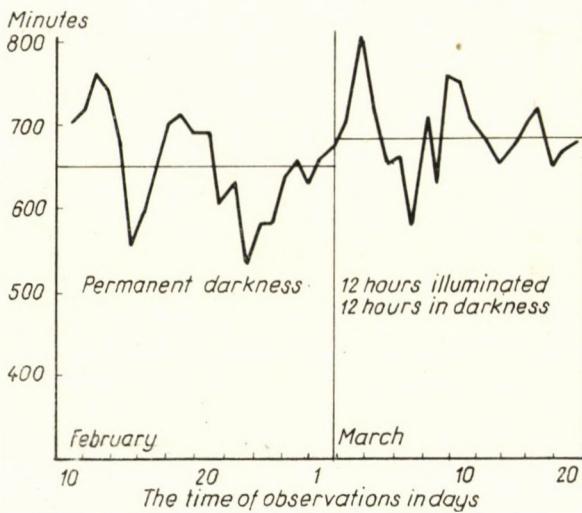


Fig. 10. Insignificant reduction in the length of the activity of brown rat in permanent darkness. For further explanation see Fig. 7

### Discussion

As a point of considerable importance we succeeded to establish beyond doubt that the spontaneous activity of brown rats is invariably more intensive than that of the domesticated white rat. This justifies the concept, that domestication diminishes the irritation of the animals. Csik [13] has made a compa-

rison between the metabolism of the domesticated and wild forms of rabbit and pointed out that the metabolism of the latter is significantly higher. When drawing a parallel between our results and those of CsiK, though comparative investigations of the spontaneous activity of rabbit has not been carried out yet, we think it possible to extend the conclusions drawn from the study of spontaneous activity. The higher metabolism is connected with more intensive and longer motoric activity. On the other hand, if decrease of the spontaneous activity under the influence of an external factor is noticed, we may probably conclude on the reduction of metabolism.

**Table 2**  
*Distribution of the Time of Moving*

	Per cents of the total activity	
	Brown rat	White rat
In the 12 hours of darkness	78.4	64.3
In the 12 hours of light	21.6	35.7
In permanent light 20 <sup>h</sup> to 8 <sup>h</sup>	55.8	52.6
8 <sup>h</sup> to 20 <sup>h</sup>	44.2	47.4
In permanent darkness 20 <sup>h</sup> to 8 <sup>h</sup>	67.3	57.6
8 <sup>h</sup> to 20 <sup>h</sup>	32.6	42.4

When examining the results with regard to the biorhythm we are faced with much more complicated problems. First of all it may be stated that the diurnal rhythm of the spontaneous activity in rat is influenced by several factors. A study of individual factors were possible only if the effect of all the others could be excluded, an insoluble problem, since not all of the causes are known as yet. Thus it is hardly possible to determine the most important influencing factor, since the effects, are not of the same kind. While the activity of wharf rat is highly influenced for example by the proximity of man and by noises, etc., the very same factors have no effect on the white rat. On the other hand the diurnal rhythm of the white rat is altered by changing the time of feeding, but it is without any effect on the brown rat. Changes of light are markedly reflected by the actogram of the brown rat, but only slowly and indistinctly by that of the white rat. We are of the opinion that no single factor can be selected that would determine the march of the rhythm. Of the influencing factors the most important is always that which exerts in the given case the largest influence on the existence of the animal. These factors do not act of course in extreme cases only (where they become dominant), but under

normal conditions as well. In this case the influencing factors may coincide in an advantageous or in a disadvantageous pattern. An advantageous coincidence of the factors controlling the rhythm is for example the evening feeding, the lower temperature during the dark period, the absence of man, large space available for movement etc., i. e. all instances when the factors support, strengthen the effect of each other. Factors influencing the rhythm may coincide, however, also in a disadvantageous manner, when they are hampering the effect of one another or completely mar it.

Finally, it ought to be emphasized that there is no reason to interpret the rythm prevailing in the spontaneous activity of rat as some peculiar intrinsic feature. Neither is there any reason to connect it by force with some particular external or environmental factor. And even if such factors may exist in reality their effect from the physiological point of view is completely negligible under the natural conditions of the rat. The fact alone, that the change of a well controllable external effect (e. g. continuous light in the case of the wharf rat) might deeply and rapidly influence the course of spontaneous activity, regularly recurring so far (e. g. an animal characterized by monophase after 4 days exhibits polyphasic activity) makes the significance of particular and special factors of any kind very doubtful.

In our opinion, the diurnal rhythm of spontaneous activity is one of the most interesting examples of the inter-action of organism and environment.

#### LITERATURE

1. APPEL, W. (1939) Über die Tagesschwankungen der Eosinophilen. *Z. ges. exp. Med.*, **104**, 15—21.
2. APPEL, W., HANSEN, K. J. (1952) Lichteinwirkung, Tagesrhythmik der eosinophilen Leukocyten und Hypophysenbennierenrindensystem. *Deutsch. Arch. klin. Med.*, **199**, 530—537.
3. ASCHOFF, J. (1952) Aktivitätsperiodik von Mäusen im Dauer dunkel. *Pflüg. Arch.*, **255**, 189—196.
4. ASCHOFF, J. (1952) Frequenzveränderungen der Aktivitätsperiodik bei Mäusen im Dauer licht und Dauer dunkel. *Pflüg. Arch.*, **255**, 197—203.
5. ASCHOFF, J. (1955) Tagesperiodik bei Mäusestämmen unter konstanten Umgebungs bedingungen. *Pflüg. Arch.*, **262**, 51—59.
6. BARNETT, S. A. (1958) An analysis of social behaviour in wild rats. *Proc. Zool. Soc. London*, **130**, 107—151.
7. BÄNDER, A. (1950) Die Beziehungen des 24-Stunden-Rhythmus vegetativer Funktionen zum histologischen Funktionsbild endokriner Drüsen. *Z. ges. exp. Med.*, **115**, 229—250.
8. BROWMANN, L. G. (1938) Effect of bilateral optic enucleation on body weights of rats under various light conditions. *Anat. Rec.*, **72**, suppl. 41.
9. BROWMANN, L. G. (1942) The effect of bilateral optic enucleation on the voluntary muscular activity of the albino rat. *Journ. Exp. Zool.*, **91**, 331—343.
10. BROWMANN, L. G. (1943) The effect of controlled temperatures upon the spontaneous activity rhythmus of the albino rat. *Journ. Exp. Zool.*, **94**, 477—483.
11. BROWN, F. A. JR., SHRINER, J., RALPH, C. L. (1956) Solar and lunar rhythmicity in the rat in "constant conditions" and the mechanism of physiological time measurement. *Amer. Journ. Physiol.*, **184**, 491—496.
12. BROWN, L. E. (1956) Field experiments on the activity of the small mammals, *Apodemus*, *Clethrionomys* and *Microtus*. *Proc. Zool. Soc. London*, **126**, 549—564.

13. Csík, L. (1957) Alapanyagcsere mérések házi- és üregi nyulakon, valamint azok hibridjein. Grundstoffwechsel-Messungen an Haus- und Wildkaninchen. *Annal. Biol. Tihany*, **24**, 3—10. (In Hungarian, German summary.)
14. DURUP, H. (1956) Observations sur le rythme de l'activité du campagnol des champs (*Microtus arvalis*). *Mammalia*, **20**, 390—404.
15. Филатова, Г. Л. (1949) Суточный ритм у грызунов и насекомоядных и опыт его экспериментального изучения. In Быков, К. М. Опыт изучения периодических изменений физиологических функций в организме. Изд. Ак. Мед. Наук СССР. Москва. 116—130.
16. HALBERG, F., VISSCHER, M. B., BITTNER, J. J. (1953) Eosinophil rhythm in mice: range of occurrence; effects of illumination, feeding and adrenalectomy. *Amer. Journ. Physiol.*, **174**, 109—122.
17. HETÉNYI, G. JR. (1957) A kísérleti eredmények statisztikai értékelése. In Kovách, A. A kísérleti orvostudomány vizsgáló módszerei. Akadémiai Kiadó, Budapest. 666—702. (In Hungarian.)
18. JORES, A. (1938) Endokrines und vegetatives System in ihre Bedeutung für die Tages-periodik. *Dtsch. med. Wochenschr.*, **64**, 989—998.
19. KURCZ, M., KECSKEMÉTI, I., SÓSKY, G. (1959) Diurnal variation in the volume and composition of the urine of albino rat. *Acta Biol. Hung. suppl.*, **3**, 43.
20. KURCZ, M. (1960) Unpublished results.
21. LEVINSON, L., WELSH, J. H., ABRAMOWITZ, A. A. (1941) Effect of hypophysectomy on diurnal rhythm of spontaneous activity in the rat. *Endocrinology*, **29**, 41—46.
22. Майзелис М. Р., Руттенбург С. О. (1949) Суточный ритм активности и температуры тела у крыс. In Быков, К. М. Опыт изучения периодических изменений физиологических функций в организме. Изд. Ак. Мед. Наук СССР. Москва. 131—142.
23. MÖDLINGER, G., KONDICS, L., KOVÁCS, J., KURCZ, M., ODORFER, M. M. (1958) Diurnal rhythm in the endocrine organs of white mice. *Acta Biol. Hung. suppl.*, **2**, 38.
24. MUNN, N. L. (1950) Handbook of psychological research on the rat. Cambridge, Riverside Press.
25. OSTERMANN, K. (1956) Zur Aktivität heimischer Muriden und Gliriden. *Zool. Jahrbuch. Physiol.*, **66**, 355—388.
26. Щербакова, О. П. (1949) Суточная периодика физиологических функций у некоторых отрядов млекопитающих. In Быков, К. М. Опыт изучения периодических изменений физиологических функций в организме. Изд. Ак. Мед. Наук СССР. Москва. 15—42.
27. SLONAKER, J. R. (1912) The normal activity of the albino rat from birth to natural death, its rate of growth, and duration of life. *Journ. An. Behavior*, **2**, 20—42.
28. SLONAKER, J. R. (1925) The effect of copulation, pregnancy, pseudopregnancy and lactation on the voluntary activity and food consumption of the albino rat. *Amer. Journ. Physiol.*, **71**, 362—394.
29. SLONAKER, J. R. (1925) Analysis of daily activity of the albino rat. *Amer. Journ. Physiol.*, **73**, 485—503.
30. STEVENSON, J. A., RIXON, R. H. (1957) Environmetal temperature and deprivation of food and water on the spontaneous activity of rats. *Yale J. Biol. & Med.*, **29**, 575—584.
31. SZYMANSKI, J. S. (1914) Eine Methode zur Untersuchung der Ruhe und Aktivitätsperioden bei Tieren. *Pflüg. Arch.*, **158**, 343—386.
32. SZYMANSKI, J. S. (1918) Die Verteilung der Ruhe und Aktivitätsperioden bei weissen Ratten und Tanzmäusen. *Pflüg. Arch.*, **171**, 324—363.
33. SZYMANSKI, J. S. (1918) Versuche über den Lernvorgang bei den weissen Ratten während der Ruhe- bzw. Aktivitätsperioden. *Pflüg. Arch.*, **171**, 311—324.
34. WANG, G. H. (1923) The relation the "spontaneous" activity and oestrus cycle in the white rat. *Comp. Psychol. Monographs*, **2** (6), 1—38.

#### VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DER SPONTANEN AKTIVITÄT VON ALBINO- UND WANDERRATTEN

Unter verschiedenen Verhältnissen wurde mit Hilfe der aktographischen Registration die spontane Aktivität der Albino- und Wanderratten verglichen und festgestellt, dass die Albino-ratte eine polyphasische, die Wanderratte dagegen monophasische Aktivität aufweist. Die Wanderratte ist längere Zeit hindurch aktiv mit kürzeren Ruhestadien als bei der Albinoratte.

Die Hungerstadien, sowie die Dauer der Fütterungen beeinflussen entscheidend die spontane Aktivität der Albinoratten, während die der Wanderratten nur in geringerem Masse verändert wird. Durch Hungerstadien verlängert sich bei der Albinoratte die Zeitdauer der Aktivität bedeutend; bei der Wanderratte ist sie viel kürzer. Die Veränderungen der Zeitpunkte der Fütterung und Pflege beeinflussen das Ablauen der spontanen Aktivität bei der Albinoratte, auf die Wanderratte hingegen sind sie ohne Einfluss.

Die periodischen Veränderungen des Lichtes und der Dunkelheit sind auf die Bewegung der Tiere von entscheidender Bedeutung; ihr Einfluss ist jedoch auf die Wanderratte grösser als auf die Albinoratte. Durch das Vertauschen des Lichtes und der Dunkelheit wird die spontane Aktivität der Wanderratte schon nach vier Tagen verändert, während die der Albinoratte erst nach zehn-fünfzehn Tagen. Die Dauerbeleuchtung, sowie die dauernde Dunkelheit verringert in gleicher Weise die lokomotorische Aktivität, bei der Wanderratte wird sogar auch der Charakter verändert.

Die erhaltenen Ergebnisse veranlassen den Verfasser Folgerungen bezüglich der Gestaltung und Beeinflussung des Biorhythmus zu ziehen.

### СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПОНТАННОЙ АКТИВНОСТИ БЕЛОЙ И СЕРОЙ КРЫС

Автор сопоставил спонтанную активность белой и серой крыс с помощью актографной регистрации, при различных условиях среды. Он установил, что белая крыса показывает полифазную активность, а серая крыса — монофазную. Серая крыса дольше активна, и на более короткий срок спокойна, чем белая крыса.

Продолжительность голодания и кормления в большей мере влияет на активность белой крысы, чем на активность серой крысы. Под влиянием голодания длительность активности белой крысы значительно увеличивается, а активность серой крысы лишь в небольшой мере. Изменение времени кормления изменяет ход спонтанной активности белой крысы, но не изменяет его у серой крысы.

Периодическое чередование света и темноты решающим образом влияет на движение животных, но влияние его на серую крысу сильнее, чем на белую крысу. Изменение света и темноты изменяет спонтанную активность серой крысы уже за 4 дня, а активность белой крысы — лишь за 10—15 дней. Постоянный свет и постоянная темнота одинаково уменьшают локомоторную активность, а у серой крысы они изменяют даже характер этой активности.

На основе полученных результатов автор делает выводы в связи с возникновением биоритма и с воздействием на биоритм.

MIHÁLY KURCZ, Budapest VIII., Puskin u. 3., Hungary.



# GENETICAL DIFFERENCES IN THE PHOTOSYNTHETICAL UTILIZATION OF LIGHT

## I. LABILITY OF ASSIMILATORY PIGMENTS AT DIFFERENT LIGHT INTENSITIES

B. FALUDI, ÁGNES FALUDI-DÁNIEL and I. GYURJÁN

DEPARTMENT OF PHYLOGENETICS AND GENETICS, EÖTVÖS LORÁND UNIVERSITY, BUDAPEST  
(HEAD: B. FALUDI)

(Received June 23, 1960)

### Summary

Studies were carried out on the synthesis of assimilatory pigments by normal and albino corn seedlings at different light intensities.

It has been found that the various light intensities applied affect the synthesis and breakdown of pigments differently.

Low light intensities favour the synthesis of carotenoids whereas high light intensities mainly promote chlorophyll development. The dependence of pigment accumulation on light intensity is not linear. Strong illumination promotes the breakdown of pigments to a greater extent than their synthesis. This might be one of the limiting factors of photosynthesis.

The turnover rate of pigments is dependent on intraspecific hereditary properties and depending on the light intensity it may be different in individuals of a single species.

### Introduction

Theoretically 35 per cent of the light energy is converted into chemical energy during photosynthesis [10]. Under experimental conditions the energy conversion amounts only to 10 per cent [11] whereas not more than 1 to 2 per cent is utilized in the field [27].

The extent of photosynthetic utilization of light is mainly regulated by the hereditary light tolerance of the various plant species [24] but it is also affected by the age of the plants [25], by the temperature [18] and by the nutritional status of the tissues [26]. Only a limited number of data are available as to the physiological factors involved in the regulation of light tolerance. The extremely light sensitive albino plants offer a very suitable experimental material for studies on the physiology of light tolerance.

It has been shown that the light sensitivity of the photosynthetic apparatus is greatly dependent on the protein metabolism [13, 19], on the extent of esterification of chlorophyll [29], on the carotenoid composition of chloroplasts [16, 17] and on the enzyme systems participating in the metabolism of photolytic products.

The pigments of the plastids are constantly broken down and resynthesized [2, 30, 31, 32]. The pigment content is constant within a given range of light intensity. Strong [14] or weak [15] illumination favours the pigment breakdown and at light intensities above the saturation level of photosynthe-

sis the processes involved in the biosynthesis of the pigments become also damaged [5]. The damage might be very intensive and lead to the destruction of the ultrastructure of the chloroplasts [35] which cannot be regenerated even after the restoration of the normal light regime [21].

Previous studies on normal and albino corn leaves conducted in this laboratory indicated that the chlorophyll composition of albinos is normal, whereas their carotenoids exhibit a higher number of saturated double bonds than those of the normal leaves [14]. The effect of light intensity on the pigment content of normal and albino leaves was also studied. It has been found that optimum curves for albino and normal tissues differ. The optimal light intensity is lower by almost two orders of magnitude for albino plants.

The question arises whether the light-induced decrease in pigment content of the albino leaves is only due to photodestruction of the pigment molecules or the light inhibition of processes playing a role in pigment synthesis has also an equal or even major importance. Studies were, therefore, undertaken to investigate the above problem by comparing the pigment content and the amount of newly synthesized pigments of albino and normal leaves kept under strong and weak illumination, respectively.

### Materials and methods

A population of corn seedlings obtained by inbreeding or open pollination of a line "Martonvásár 1135/55" heterozygous for albinism was used throughout the experiments. The ratio of normal and albino individuals of the population studied was approximately 3 : 1. A characteristic property of the strain is that the kernels containing albino sporophytes can be recognized from their light yellow color and consequently the normal and albino individuals be separated before germination takes place. Seeds were germinated in a thermostate for 4 days at 30 °C. The leaves of the seedlings were then exposed for 48 hours to a range of light intensities in a  $^{14}\text{CO}_2$  containing atmosphere ( $\sim 300 \mu\text{C/l}$ ). The pigments were extracted by the method of KOSKI [22] and chromatographed according to SAPOSHNIKOV [33]. The pigments were eluted from the chromatographic paper and the pigment content of the various spots determined. The spots corresponding to carotenoids contained a mixture of compounds, therefore pigment content of leaves was compared on the basis of extinction values obtained at 420 m $\mu$ . The amount of chlorophyll *a* was determined by measuring the absorption at 425 m $\mu$ , whereas that of chlorophyll *b* was assayed at 430 m $\mu$  [29]. Aliquot amounts of the pigment-containing solutions were evaporated to dryness on aluminium plates and the amount of  $^{14}\text{C}$  incorporated was measured by a gas-flow counter (G—M tube; geometry:  $2\pi$ ).

### Results

The carotenoid content of normal and albino leaves exposed to various light intensities is shown in Table 1.

Table 1 shows that the carotenoid content of normal leaves, within the ranges applied in the experiments, increases upon illumination with higher light intensities. Illumination with different light intensities influences the amount of various pigments differently. Strong illumination mainly results in the increase in carotenoids of higher oxidation level. Carotene and xantho-

**Table 1***Carotenoid content of normal and albino corn leaves exposed to various light intensities*(Ext  $\frac{1}{420}$  cm mμ/g fresh weight/5 ml ether)

Substance	Normal				Albino				
	R <sub>f</sub>	0.95	0.85	0.65	Total	0.95	0.85	0.65	Total
Lux	5	0.48	0.90	0.16	1.54	3.90	0.02	0.01	3.93
	100	0.58	0.94	0.58	2.10	4.80	0.06	0.06	4.92
	1000	0.80	1.68	0.65	3.13	4.56	0.07	0.06	4.69
	10000	1.62	2.50	1.05	5.17	0.78	0.05	0.05	0.87

*Normal leaves* — the spot of R<sub>f</sub> 0.95 contains mainly carotenoids, the spot of R<sub>f</sub> 0.85 xanthophylls and that of R<sub>f</sub> 0.65 carotenoids of higher oxidation level.

*Albino leaves* — spot R<sub>f</sub> 0.95 contains the characteristic yellow carotenoid of the albino; spots R<sub>f</sub> 0.85 and 0.65 contain slightly fluorescent "colorless" carotenoids

phyll are influenced to a lesser extent. In albino leaves, if illuminated by low light intensities, the carotenoid content increases. Medium light intensities, on the other hand result in decrease in carotenoids and strong illumination leads to their heavy destruction.

The chlorophyll contents of normal and albino leaves exposed to various light intensities are summarized in Table 2.

**Table 2***Chlorophyll contents of normal and albino corn leaves exposed to various light intensities*

(γ/g fresh weight)

Substance	Normal				Albino				
	chl-a	chl-b	total chl	chl-a chl-b	chl-a	chl-b	total chl	chl-a chl-b	
Lux	5	72	45	117	1.60	13	18	31	0.72
	100	97	59	156	1.65	19	15	34	1.13
	1000	221	130	351	1.70	28	13	41	2.16
	10000	366	214	580	1.70	1	<1	1	—

It is clear from Table 2 that within the ranges of light intensities applied the chlorophyll contents of normal leaves are increasing. The concentration of chlorophyll *a* is somewhat more increased at higher light intensities than that of chlorophyll *b*. In albino leaves the amount of chlorophyll *a* increases upon illumination with low or medium light intensities. Strong illumination results in the breakdown of chlorophyll *a*. By contrast the concentration of chlorophyll *b* decreases in illuminated albino leaves even at low light intensities. Con-

sequently an increase upon illumination of the ratio chlorophyll *a* chlorophyll *b* can be observed which is higher than the increase of the same ratio in illuminated normal leaves.

In order to obtain an idea about the comparative rate of anabolic and catabolic processes determining the *in vivo* pigment level, the incorporation of  $^{14}\text{CO}_2$  into the pigments in question was studied at different light intensities. Data on the activity recovered in the various pigments are summarized in Table 3.

Table 3

*The effect of various light intensities on the incorporation of  $^{14}\text{C}$  into the assimilatory pigments of normal and albino corn leaves*

( $10^3$  cpm/g fresh weight)

Material	Normal				Albino			
	5	100	1000	10000	5	100	1000	10000
$R_f$	0.95	42.0	43.5	48.4	35.1	30.8	35.4	34.0
	0.85	1.6	1.8	3.3	8.1	2.4	1.6	2.4
	0.65	3.0	2.1	0.9	3.2	1.9	0.9	1.4
	0.50	7.2	11.0	26.7	67.0	2.7	3.0	5.3
	0.35	2.1	4.0	9.7	33.8	2.0	1.6	2.3
Total	55.9	62.4	89.0	147.2	39.8	42.5	45.4	24.9

It appears that a considerable amount of radioactivity is incorporated into the pigments of normal and albino leaves even in the dark (5 lux). In this case the bulk of  $^{14}\text{C}$  appears in the carotenoids. In normal leaves the increase in illumination channels the  $^{14}\text{C}$  incorporation towards the chlorophylls. It seems that the strong illumination applied is supraoptimal as related to carotene synthesis in normal leaves. At the same time the activity of the xanthophyll containing spot increases. The carotenoid and chlorophyll spots of albino leaves exhibit lower activities than the corresponding spots from normal leaves, although low or medium level illuminations slightly promote the processes of pigment synthesis in albino tissues. Strong illumination apparently inhibits the pigment synthesis of albinos since the activity recovered in their pigments is lower than that obtained with controls kept in darkness.

The specific activity of pigments presented in Tables 4 and 5 gives some information about the balance of anabolic and catabolic processes of pigment metabolism.

It appears from Table 4 that the specific activity (referred to the extinction values obtained at  $420\text{ m}\mu$ ) of the upper carotenoid spot decreases upon stronger illumination. At the same time the specific activity of the xanthophyll

Table 4

*Specific activity of carotenoids extracted from normal and albino leaves exposed to various light intensities*

$$\begin{array}{c} \text{10}^3 \text{ cpm/g fresh weight} \\ \hline \text{Ext } \frac{1}{420 \text{ m}\mu} \text{ cm/g fresh weight} \end{array}$$

Material	Normal			Albino			
	R <sub>f</sub>	0.95	0.85	0.65	0.95	0.85	0.65
Lux 5		87.5	1.8	18.7	7.9	120.0	190.0
100		75.0	1.9	3.6	7.4	268.0	150.0
1000		60.5	2.0	1.4	7.4	400.0	200.0
10000		21.5	3.2	3.1	21.8	500.0	560.0

spot increases. The specific activity of carotenoids of higher oxidation level is the highest in leaves kept in darkness.

In albino leaves kept in darkness or exposed to low or medium intensity illumination the specific activity of the upper carotenoid spot is the same but it increases upon strong illumination. It seems that the specific activity of the colorless carotenoids decreases in the case of illumination at higher light intensities. However, these data should be considered with caution as the absorption of carotenoids determined at 420 m $\mu$  is not an adequate measure of their concentration.

Table 5

*Specific activity of chlorophylls in normal and albino leaves exposed to various light intensities*

$$\begin{array}{c} \text{10}^3 \text{ cpm/g fresh weight} \\ \hline \text{mg pigment/g fresh weight} \end{array}$$

Material	Normal			Albino		
	chl-a	chl-b	chl-a chl-b	chl-a	chl-b	chl-a chl-b
Lux 5	100	47	2.1	208	112	1.9
100	113	68	1.7	158	117	1.4
1000	120	75	1.6	190	177	1.1
10000	184	158	1.2	1200	~8000	0.2

It is clear from Table 5 that the specific activity of chlorophylls is increasing at higher light intensities both with normal and albino leaves. This phenomenon is more pronounced in albino tissues and particularly evident in the case of chlorophyll b.

### Discussion

Comparative studies on the pigment content of normal and albino leaves exposed to various light intensities indicated that the illumination influences the amount of various pigments differently. In normal leaves the concentration of oxygen-containing carotenoids is more explicitly increased at higher doses of illumination than that of the carotens. A shift in the composition of carotenoids depending upon light intensity was also observed by SAPOSHNIKOV *et al.* [34] and BLASS *et al.* [3], who explained this phenomenon by the oxygen carrier nature of carotenoids. In weak light even the partially saturated carotenoids of albino leaves accumulate. At higher light intensities, however, their concentration decreases. A similar pattern was observed with *Rhodospirillum* mutants containing partially saturated carotenoids [7] and with their phenocopy obtained with diphenylamin [16]. According to CALVIN's hypothesis [17] the double bonds of the carotenoids react with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by the photolysis of water. At low light intensities even carotenoids having only a limited number of double bonds are able to meet the requirements. Increased photolytic rates at higher light intensities and the shift of the overall cell metabolism towards a higher redox potential might lead, however, to the saturation of these carotenoids. Consequently H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (or HO<sub>2</sub>) accumulates and might destroy the carotenoids and some other elements of the photosynthetic apparatus as well.

In the line studied there is no major difference between the protochlorophyll content of normal and albino leaves [9]. In spite of this the amount of chlorophyll synthesized by the albinos is lower. A number of explanations can be offered to account for this phenomenon. It may be assumed that the protochlorophyll of albino leaves contains less "active" components able to serve as precursor molecules [23]. A second possibility is that the light intensity necessary to catalyse the protochlorophyll → chlorophyll conversion is high enough to inhibit the metabolic processes yielding building blocks for porphyrin synthesis (KREBS cycle). The third explanation would be the photo-destruction in albinos of chlorophyll molecules synthesized at a normal rate even if illuminated with relatively low light intensities.

On the basis of tracer incorporation rates we may come to the conclusion that weak illumination favours the synthesis of carotenoids, whereas strong illumination promotes the chlorophyll synthesis. The high light intensity inhibits the incorporation into the carotene of the upper spot. On the other hand the incorporation into the two further carotenoid spots is stimulated by strong illumination. The chlorophyll synthesis of normal leaves is speeded up by high light intensities. By contrast, the metabolic processes involved in chlorophyll biosynthesis in albino leaves are perhaps damaged by strong illumination (10 000 lux) as indicated by the low incorporation rates which are surpassed even by the dark controls.

The determination of specific activity of carotenoids in normal leaves revealed interesting regularities: the specific activity of compounds in the upper carotene spot decreases at higher light intensities. No similar data are to be found in the literature. The explanation therefore should be based exclusively on ideas which can be deduced from the isotopic data. These are in favour of the view that the decrease in specific activity connected with a concomitant increase in the absolute quantity of the substance in question should be explained by the channeling of a "stored" substance into the pathway of carotenoid biosynthesis. The increase in specific activity of the xanthophyll spot is indicative of an increased turnover rate. The lack of correlation between light intensity and specific activity in the case of the lower carotenoid spot is difficult to explain. The most plausible explanation would be to suppose that the different light intensities affect the various components of the spot to various extents.

The pattern of specific activity of carotenoids in albinos is similar to that observed in normal plants.

The specific activity of chlorophylls is increasing upon illumination with higher light intensities both in albino and green leaves. This indicates that the light-induced higher speed of chlorophyll synthesis is overbalanced by a higher destruction in albinos.

SHLYK *et al.* [30, 31, 32] emphasize the importance of species differences as to the speed of the turnover rate of chlorophylls. According to KAZARIAN *et al.* [20] the developmental stage of the plants plays a major role in this respect. The present study revealed that the turnover rate of assimilatory pigments depends on intraspecific hereditary factors and depending on the light intensity might differ in individuals of a species even of the same age.

#### LITERATURE

1. ANDERSON, J. C., ROBERTSON, D. S. (1959) Carotenoid protection of chlorophyll photo-destruction. *Proc. 9<sup>th</sup> Internat. Bot. Congr.*, 2, 6.
2. Андреева, Т. Н., Нальборчик, Е. Я. (1959) К вопросу о влиянии физиологического состояния растений и некоторых внешних воздействий на состав продуктов фотосинтеза. *Докл. Акад. Наук СССР*, **114**, 662—665.
3. BLASS, U., ANDERSON, J. M., CALVIN, M. (1959) Biosynthesis and possible functional relationships among the carotenoids and between chlorophyll *a* and chlorophyll *b*. *Plant Physiol.*, **34**, 329—333.
4. BRUGGER, J. E., FRANCK, J. (1958) Experimental and theoretical contribution to studies of the afterglow of chlorophyll in plant materials. *Biochem. Biophys. Acta*, **75**, 465—496.
5. CALVIN, M. (1956) The photosynthetic carbon cycle. *Proc. III. Internat. Congr. Biochem.*, 211—225.
6. CLAES, H. (1957) Biosynthese von Carotinoiden bei *Chlorella*. III. *Z. Naturforschg.*, **12b**, 401—407.
7. COHEN-BAZIRE, G., SISTROM, W. R., STANIER, R. Y. (1957) Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **49**, 25—68.
8. Чернявина, И. А., Рубин, В. А., Николаева, Л. Ф. (1959) К вопросу об участии цитохромоксидазы в процессе синтеза хлорофилла. *Докл. Акад. Наук СССР*, **114**, 1080—1083.
9. F. DÁNIEL, Á. (1958) Malonsav gátlás hatása genetikai albino és zöld kukoricalevelek

- ketosavtartalmára. The effect of malonic acid inhibitor on the ketonic acid content of genetically albino and green corn leaves. *Biol. Közl.*, **6**, 23—29. (Hungarian, with English summary.)
10. DANIELS, F. (1956) Energy efficiency in photosynthesis. In HOLLOWAY A., *Radiation Biology*, **3**, 259—293.
  11. EHRLICHTRAUT, H. C., RABINOWITCH, E. (1952) Kinetics of the Hill reaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **38**, 67—84.
  12. FALUDI, B., DÁNIEL, F. Á. (1958) Differenzen im Atmungssystem bei Albino- und normalen Maisblättern. *Naturwiss.*, **45**, 449.
  13. FALUDI, B., GYURJÁN, I., F. DÁNIEL, Á. (1960) A foszfor beépülése a normális és genetikailag albino kukoricacsírányok foszforfrakcióiba. Incorporation of phosphorus in the phosphorous fractions of normal and genetically albino leaves. *Biol. Közl.*, **8**, 25—31. (In Hungarian, with English summary.)
  14. FALUDI, B., DÁNIEL, F. Á., KELEMEN, G. (1960) Increased photosensitivity of leaf pigments and its relation to the respiratory system in albino mutants of corn. *Physiol. Plantarum*, **13**, 227—236.
  15. FRANKS, S., KENNEY, A. L. (1955) Chlorophyll and carotenoid destruction in the absence of light in seedlings of *Zea mays* L. *Plant Physiol.*, **30**, 413—418.
  16. FULLER, R. C., ANDERSON, I. C. (1958) Suppression of carotenoid synthesis and its effect on the activity of photosynthetic bacterial chromatophores. *Nature*, **181**, 252—254.
  17. GRIFFITHS, M., SISTROM, W. R., COHEN-BAZIRE, G., STANIER, R. Y. (1955) Function of carotenoids in photosynthesis. *Nature*, **176**, 1211—1215.
  18. HOLM, G. (1954) Chlorophyll mutations in barley. *Acta Agric. Scand.*, **4**, 457—471.
  19. KANDLER, O., SCHÖTZ, F. (1956) Untersuchungen über die photooxidative Farbstoffzerstörung und Stoffwechselhemmung bei Chlorellamutanten und panaschierten Oenotheren. *Z. Naturforschg.*, **11b**, 708—718.
  20. Կազարյան, Բ. Օ., Գաբրիելյան, Գ. Ր., Աղաբայան, Վ. Ռ. (1957) О связи между интенсивности фотосинтеза, энергией возобновления хлорофилла. Докл. Акад. Наук Арм. ССР, **24**, 225—230.
  21. Кок, В., BUSINGER, J. A. (1957) Recent results in Wageningen III. Photoinhibition. *Res. in Photosynth. Conf. in Gatlinburg*. Gaffron, New York. 357—366.
  22. KOSKI, V. M. (1950) Chlorophyll formation in seedling of *Zea mays* L. *Arch. Biochem. Biophys.*, **29**, 339—343.
  23. Красновский, А. А., Быстрова, М. И. (1960) Изучение образования хлорофилла в гомогенатах этиопиорированных листьев методом флюоресцентной спектрофотометрии. *Биохимия*, **25**, 167—179.
  24. MONTFORT, C., FELGNER, I., MÜLLER, L. (1952) Zeitphasen im Jahreslauf des lichtökologischen Chlorophyllspiegels beim photostabilen Laubblatt. *Beitr. Biol. Pflanzen*, **29**, 106—128.
  25. ROUX, E., HUSSON, C. (1952) Pigments des chloroplasts et photosynthèse. *C. R. Acad. Sci.*, **234**, 1573—1574.
  26. SAGROMSKY, H. (1957) Zur Chlorophyllbildung bei einer grüngescheckten Tomate. *Ber. dtsch. bot. Ges.*, **70**, 251—258.
  27. SAUBERER, F., HÄRTEL, O. (1959) Pflanze und Strahlung. Leipzig. Akad. Verlag.
  28. SMITH, J. H. C., BENITEZ, A. (1955) Chlorophylls: analysis in plant materials. In PAECH, K. TRACEY, M. V. *Modern Methods of Plant Analysis*, **4**, 142—197.
  29. SMITH, J. H. C., DURHAM, L. J., WURSTER, C. F. (1959) Formation and bleaching of chlorophyll in albino corn seedlings. *Plant Physiol.*, **34**, 340—345.
  30. Шлык, А. А., Годнев, Т. Н., Ротбарь, Р. М., Пляхнович, Я. П. (1957) Об особенностях биосинтеза двух компонентов хлорофилла в процессе обновления. Докл. Акад. Наук ССР, **113**, 1324—1327.
  31. SHLYK, A. A., GODNEV, T. N. (1958) Interrelation of chlorophyll components and carotenoids in biosynthesis. *Radioisotopes in Scientific Research. I. UNESCO Conf.*, **4**, 479—493.
  32. Шлык, А. А. (1959) Изучение процесса обновления хлорофилла методом меченых атомов. In Курсанов, А. Л., Проблемы фотосинтеза. 179—186. Москва.
  33. Сапожников, Д. И., Бронштейн, И. А., Красновская, Т. А. (1955) Применение метода бумажной хроматографии для анализа пигментов пластид зеленого листа. *Биохимия*, **20**, 286—292.
  34. Сапожников, Д. И., Красновская, Т. А., Маевская, А. Н. (1959) Изменение соотношения основных каротиноидов зеленого листа под действием света. In Курсанов, А. Л., Проблемы фотосинтеза. 169—175. Москва.
  35. WETTSTEIN, D. V. (1959) Spectrophotometric studies of chlorophyll mutants in barley. *Yearbook of Carnegie Inst.*, **58**, 338—339.

## GENETISCHE DIFFERENZEN IN DER PHOTOSYNTHETISCHEN AUSNÜTZUNG DES LICHTES

### I. Labilität der Assimilationspigmente bei verschiedenen Lichtintensitäten

Die Assimilationspigmentbildung wurde bei verschiedener Lichtintensität in den Blättern von normalen und Albino-Maiskeimpflanzen untersucht, und festgestellt:

daß die Lichtintensität die Bildung und Zersetzung der einzelnen Pigmente in verschiedener Weise beeinflußt.

Schwaches Licht fördert die Anhäufung von Karotinoiden, stärkeres Licht eher die Anhäufung von Chlorophyll. Der Zusammenhang zwischen der Pigmentanhäufung und der Lichtintensität ist nicht linear; starkes Licht erhöht die Destruktion der Farbstoffe sowohl in normalen, als auch in Albinoblättern in höherem Maße, als ihre Bildung; vermutlich ist dieser Umstand eines der Hemmungsmomente der photosynthetischen Ausnützung des starken Lichtes.

Die Geschwindigkeit der Erneuerung der einzelnen Farbstoffe kann in Abhängigkeit von erblichen artspezifischen Eigenheiten und von der Lichtintensität auch bei der gleichen Art verschieden sein.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РАЗНОСТИ В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОМ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СВЕТА

### I. Лабильность ассимиляционных пигментов при различной интенсивности света

В листьях нормальных и албиносовых прорастающих растений кукурузы исследовано образование ассимиляционных пигментов при различной интенсивности света.

Установлено, что интенсивность света различным образом воздействует на образование и разложение отдельных пигментов.

Слабый свет благоприятствует накоплению каротиноидов, а сильный свет — скорее накоплению хлорофилла. Связь между накоплением пигментов и интенсивностью света не является линейной так как сильный свет повышает разложение пигментов как в нормальных так и в албиносовых листьях в большей степени, чем он способствует их образованию, что предположительно представляется один из тормозящих факторов фотосинтетического использования сильного света.

Скорость возобновления отдельных пигментов может быть — в зависимости от внутривидовых наследственных свойств и от интенсивности света — различной даже в пределах того же самого вида.

BÉLA FALUDI, Budapest, VIII. Múzeum krt. 4/a, Hungary.

ÁGNESS F. DÁNIEL, Budapest, VIII. Múzeum krt. 4/a, Hungary.

ISTVÁN GYURJÁN, Budapest, VIII. Múzeum krt. 4/a, Hungary.

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó igazgatója

Műszaki szerkesztő: Farkas Sándor

A kézirat nyomdába érkezett: 1960. IX. 5. — Terjedelem: 9,25 (A/5) ív, 51 ábra, 1 melléklet

Akadémiai Nyomda, Budapest — 1960.52027 — Felelős vezető: Bernát György

The *Acta Biologica* publish papers on biological subjects in English, German, French and Russian.

The *Acta Biologica* appear in parts of varying size, making up volumes.  
Manuscripts should be addressed to :

*Acta Biologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.*

Correspondence with the editors and publishers should be sent to the same address.

The rate of subscription to the *Acta Biologica* is 110 forints a volume. Orders may be placed with "Kultura" Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest I., Fő utca 32. Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

---

Les *Acta Biologica* paraissent en français, allemand, anglais et russe et publient des travaux du domaine des sciences biologiques.

Les *Acta Biologica* sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en volumes.  
On est prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction à l'adresse suivante :

*Acta Biologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.*

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise pour le Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultura» (Budapest I., Fő utca 32. Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

---

«*Acta Biologica*» публикуют трактаты из области биологии на русском, немецком, английском и французском языках.

«*Acta Biologica*» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи следует направлять по адресу:

*Acta Biologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.*

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции и администрации.

Подписная цена «*Acta Biologica*» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «Kultura» (Budapest I., Fő utca 32. Текущий счет 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

I N D E X

KOL, E., VARGA, L.: Beiträge zur Kenntniss der Mikroflora und Mikrofauna in den Donauarmen neben Baja (Südungarn) .....	187
DOMJÁN, Gy., MINKER, E.: Untersuchung der Phosphomonoesterasen in den zentralen Nervenganglien der Weinbergschnecke ( <i>Helix pomatia</i> ) .....	219
MUNKÁCSI, F.: Die Veränderungen der Bluteiweissfraktionen mit dem fortschreitenden Alter der Pferde .....	231
THOMA, A.: Age at menarche, acceleration and heritability .....	241
KORMOS, K.: Ruhezustand bei den Protozoen mittels Metamorphose .....	255
KURCZ, M.: A comparative study of the spontaneous activity of the white rat and the brown or wharf rat .....	271
FALUDI, B., FALUDI-DÁNIEL, Á., GYURJÁN, I.: Genetical differences in the photosynthetical utilization of light — I. Lability of assimilatory pigments at different light intensities .....	285

# ACTA BIOLOGICA

## ACADEMIAE SCIENTIARUM HUNGARICAE

ADIUVANTIBUS

B. FALUDI, V. FRENYÓ, B. GYŐRFFY, B. MÉSZÁROS,  
J. SZENTÁGOTHAI, J. TIGYI

REDIGIT

I. TÖRÖ

TOMUS XI

FASCICULUS 4



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST  
1961

ACTA BIOL. HUNG.

# ACTA BIOLOGICA

A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA  
BIOLÓGIAI KÖZLEMÉNYEI

SZERKESZTŐSÉG : BUDAPEST IX., TŰZOLTÓ U. 58. KIADÓ HIVATAL: BUDAPEST V., ALKOTMÁNY U. 21

Az *Acta Biologica* angol, francia, német és orosz nyelven közöl értekezéseket a biológia köréből.

Az *Acta Biologica* változó terjedelmű füzetekben jelenik meg. Több füzet alkot egy kötetet. Évenként 1—2 kötet jelenik meg.

A közlésre szánt kéziratok a következő címre küldendők:

*Acta Biologica* szerkesztősége, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

Ugyanerre a címre küldendő minden szerkesztői és kiadóhivatali levelezés.

Az *Acta Biologica* előfizetési ára kötetenként belföldre 80 Ft, külföldre 110 Ft. Megrendelhető a belföld számára az Akadémiai Kiadónál (Budapest V., Alkotmány utca 21. Bankszámla 05-915-111-46), a külföld számára pedig a „Kultúra” Könyv- és Hírlap Külkereskedelmi Vállalatnál (Budapest I., Fő utca 32. Bankszámla: 43-790-057-181) vagy annak külföldi képviseleteinél és bizományosainál.

---

Die *Acta Biologica* veröffentlichen Abhandlungen aus dem Bereich der biologischen Wissenschaften in deutscher, englischer, französischer und russischer Sprache.

Die *Acta Biologica* erscheinen in Heften wechselnden Umfangs. Mehrere Hefte bilden einen Band.

Die zur Veröffentlichung bestimmten Manuskripte sind an folgende Adresse zu senden:

*Acta Biologica*, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.

An die gleiche Anschrift ist auch jede Korrespondenz für die Redaktion und den Verlag zu senden.

Abonnementspreis pro Band: 110 Forint. Bestellbar bei dem Buch- und Zeitungs-Außenhandels-Unternehmen »Kultura« (Budapest I., Fő utca 32. Bankkonto No. 43-790-057-181) oder bei seinen Auslandsvertretungen und Kommissionären.

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE KNORPELBIILDUNG

## IV. DAS GEWEBSATMUNGSVERMÖGEN DER REGENERIERENDEN GELENKFLÄCHE IN DEN VERSCHIEDENEN REGENERATIONSTADIEN

ÉVA OLÁH, Cs. HADHÁZY und KATALIN KOSTENSKY

INSTITUT FÜR ANATOMIE, HISTOLOGIE UND EMBRYOLOGIE DER MEDIZINISCHEN  
UNIVERSITÄT, DEBRECEN (VORSTAND: I. KROMPECHER)

(Eingegangen am 9. April, 1960)

### Zusammenfassung

In Fortsetzung früherer Untersuchungen wurden mit Hilfe der WARBURGSchen Technik Gewebsatmungsuntersuchungen an insgesamt 80 Hunden durchgeführt. Als Versuchsmaterial dienten regenerierende Gelenkflächen der Hunde. Nach operativer Entfernung der Gelenkfläche des distalen Femur-Endes (KROMPECHER—PUKYSches Halbgelenk) wurde das hier zustande gekommene Granulationsgewebe sowie der an der Gelenkkapsel haftende Teil des Granulationsgewebes 7, 20, 26, 33 und 70 Tage nach der Operation untersucht. In den histologischen Bildern war Knorpelbildung im Granulationsgewebe der Gelenkflächen zu beobachten, während diese Veränderung in der anderen Schicht nicht vorkam.

Nach den Untersuchungsergebnissen nimmt die Atmung der an der Gelenkfläche befindlichen Granulationsgewebsschicht vom Initialstadium beginnend bis zum 33. Tage in hohem Maße zu und von da an wieder ab. Die Atmungssteigerung der an der Gelenkkapsel haftenden Granulationsgewebsschicht verhält sich in den einzelnen Stadien qualitativ ebenso, doch ist das Maximum am 26. Tage wahrnehmbar. Untersucht man die Tätigkeit der beiden Granulationsgewebsschichten unter Voraussetzung identischer Ausgangswerte in relativen Zahlen, so kann festgestellt werden, daß die Atmungssteigerung der an der Gelenkfläche haftenden Schicht sowie die nachfolgende Atmungssenkung größeres Ausmaß zeigt als die des an der Kapsel haftenden Granulationsgewebes.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen wird als wahrscheinlich angesehen, daß die in früheren Stadien zu beobachtende Atmungssteigerung einen »Schädigungsstoffwechsel« zum Ausdruck bringt. Die nachfolgende Atmungssenkung dürfte die Folge der progredierten »Schädigungen« sein. Im Falle des Gelenkflächen-Granulationsgewebes könnte darüber hinaus zur Atmungssenkung auch der Umstand beitragen, daß eine verhältnismäßig größere Knorpelgewebsmasse entsteht, die bekanntermaßen über minimales Atmungsvermögen verfügt.

Die Atmungsveränderungen werden zum Teil auf die progrediente Gefäßpauperisation der untersuchten Materialien zurückgeführt, der indessen keine ausschließliche Rolle zufallen dürfte. Die Untersuchung der Atmungseigenschaften hat zu der Auffassung geführt, daß Atmungsuntersuchungen allein keine für das Frühstadium der Knorpelbildung charakteristische Angaben liefern, es vielmehr noch weiterer WARBURG-Untersuchungen bedarf.

### Einleitung

Bekanntlich gehen die chemischen Prozesse, welche die Lebensfunktionen der Gewebe gewährleisten, in Wechselwirkung und in organisierter Form vor sich. Ebenso wie die harmonische Zusammenarbeit die ungestörten Lebensfunktionen der Zelle garantiert, verursacht jede Schädigung dieser Organisation, wo immer sie auch auftritt, gerade mit Rücksicht auf die Gesamtorganisation bzw. auf ihre Störung in verstärktem Maße eine anomale bzw. pathologische Form der Zelltätigkeit.

Unter den Lebenserscheinungen bzw. Lebensfunktionen der Zellen ist ihr Stoffwechsel am wichtigsten. Von den Parenchymzellen weiß man z. B., daß ihre Form hauptsächlich von ihrem Stoffwechsel abhängt [4]. Eine Schädigung des Stoffwechsels führt zur Veränderung des morphologischen Bildes der Zelle. Die Alteration der auf diese grundlegendste Tätigkeit der Zelle wirkenden Faktoren manifestiert sich — angesichts der eben erwähnten Zusammenhänge — morphologisch in erster Linie an den Zellen mit lebhaftem Stoffwechsel [4, 5, 8, 9, 22, 46, 47, 51 u. a.]. An den Parenchymzellen tritt auch die Tatsache am deutlichsten in Erscheinung, daß der die Form aufrechterhaltende Stoffwechsel der Zelle mit dem funktionellen in direktem Zusammenhang steht. Das äußert sich nicht nur darin, daß die zugrunde gehende Zelle zu funktionieren nicht imstande ist, sondern vor allem in der Tatsache, daß auch der funktionelle Stoffwechsel seine Tätigkeit sogleich einstellt, wenn auch nur eine relative Schädigung des formaufrechterhaltenden Stoffwechsels zustande kommt [3, 5, 41, 42, 46, 47 u. a.].

Die Zellen des Interstitiums weisen im Vergleich zu den vorigen einen erheblich schwächeren Stoffwechsel auf. Vom ruhenden, fasernreichen und zellarmen Bindegewebe wissen wir, daß sich sein Stoffwechsel kaum bestimmen läßt [43, 44]. Auch das Stützgewebe hat eine andere Funktion als das Parenchymgewebe: es steht hauptsächlich im Dienste physikalischer (mechanischer) Aufgaben. Dennoch kann man, wenn man das Bild einzelner Veränderungen beachtet, kaum behaupten, daß diese den Faktoren gegenüber, die den Stoffwechsel beeinflussen, völlig unempfindlich wären. ROTTER [48] bemerkt z. B. in einer Mitteilung, im ätiologischen Hintergrund gewisser Gefäßwanderkrankungen (Endarteritis obliterans, Arteriosklerose) müsse mit großer Wahrscheinlichkeit Sauerstoffmangel, d. h. Hypoxydose, somit die Hemmung der Oxydationsprozesse angenommen werden.

Im Hinblick auf obige Angaben dürfte es keine Übertreibung sein, wenn wir behaupten, daß der Energiestoffwechsel einen grundlegenden Faktor für jede Zelle des Organismus darstellt.

Die Zahl der am Zellstoffwechsel teilnehmenden Substanzen und der ihn beeinflussenden Faktoren ist offenbar sehr hoch. Dennoch erscheint die Frage vielleicht einfacher, wenn wir die Tatsache berücksichtigen, daß sich zwar der Abbau der verschiedenen Nährstoffe in den Initialphasen naturgemäß unterscheidet, aber im Verlauf des Abbaus bereits Substanzen entstehen, die zugleich im Abbaustoffwechsel der Kohlenhydrate, Fette und Eiweiße in Erscheinung treten [52]. Im Stoffwechsel der Kohlenhydrate, Fette und Eiweiße ist demnach gleichsam eine Verflechtung zu beobachten. Laut STRAUB [52] entsteht durch Abbau der aus den Proteinen freigesetzten Aminosäuren hauptsächlich Brenztraubensäure, ebenso wie beim Kohlenhydratabbau. Durch Oxydation der Fettsäuren entstehen Essigsäureradikale, die wieder Oxydationsprodukte der Brenztraubensäure darstellen. Auf diese Weise ver-

einfach sich die Energieproduktion der Oxydationsprozesse im wesentlichen zu einer Frage der Oxydation der Brenztraubensäure und Essigsäureradikale. Die Oxydation dieser Substanzen aber erfolgt mit Hilfe des sog. Zitratzyklus, des SZENT-GYÖRGYI—KREBSSchen Zirkulationsprozesses.

Nach obiger Gedankenreihe erscheint die Anwesenheit oder das Fehlen des zu den biologischen Oxydationen unerlässlichen Sauerstoffs als ein Faktor, der beim Studium des Zellstoffwechsels eigentlich in erster Linie in Betracht gezogen werden muß. Und in der Tat: Pathologie und Klinik liefern zahllose Beispiele für die auf Sauerstoffmangel beruhenden, sich im Zellstoffwechsel manifestierenden Veränderungen [z. B. 2, 5, 9, 48, 53].

In vorangegangenen Untersuchungen [23, 24, 45] haben wir uns mit dem Granulationsgewebe der regenerierenden Gelenkfläche befaßt. Im Verlauf dieser Untersuchungen vermochten wir festzustellen, daß dieses Granulationsgewebe mit der Zeit immer schwächere Vaskularisation, d. h. zunehmende Gefäßpauperisation aufweist. Dieser Zustand führt unseres Erachtens zu relativem Sauerstoffmangel, was wir mit Hilfe von Hämoglobin- und Milchsäurebestimmungen [45] im einzelnen zu bestätigen und im ganzen als wahrscheinlich zu bekräftigen vermochten.

Mit unseren Untersuchungen hatten wir letzten Endes die Absicht, den Neodifferenzierungs-Knorpelbildungsprozeß zu verfolgen bzw. den Zusammenhängen zwischen Ursache und Wirkung in seiner Genese näherzukommen. An unserem Untersuchungsmodell, dem KROMPECHERSchen Hunde Halbgelenk [35, 36, 37, 38], ist das Knorpelgewebe regelrecht erschienen. Wir sind demnach in der Lage, neben der Entfaltung des mit den vorher schon erwähnten Untersuchungen in seinen Einzelheiten bestätigten, im ganzen verfolgten relativen Sauerstoffmangelzustandes im Gewebe, ja wahrscheinlich unter dessen prädisponierender Wirkung das Erscheinen einer neuen Gewebsart (Knorpel) zu beobachten.

So erforderte logischerweise einerseits die Entwicklung des Knorpelgewebes, anderseits das Zustandekommen des relativen Sauerstoffmangelzustandes im Gewebe, daß wir auch den Gewebsstoffwechsel unseres VersuchsmodeLLS untersuchen und diesen mit der Genese des Knorpelgewebes in Beziehung zu bringen suchen. Im Rahmen dieser Untersuchungsreihe betrachten wir es vor allem als unsere Aufgabe, uns über das Gewebsatmungsvermögen zu orientieren.

### Methode

Bei den vorliegenden Versuchen wurden die bei den früheren verwendeten und in den vorangegangenen Mitteilungen [23, 24, 45] ausführlich beschriebenen Materialien benutzt. Als Untersuchungsmaterial diente nach wie vor die Kniegelenkfläche des Hundefemurs, von der der Gelenkknorpel — zusammen mit der einige mm darunter befindlichen Spongiosa — vollständig entfernt wurde. (Ausführliche Angaben über die Operationsvorbereitung, die Operation sowie die Nachbehandlung siehe [23].)

Im Rahmen der Untersuchungen wurden (zusammen mit den Vor- und ergänzenden Versuchen) insgesamt 80 Hunde verwendet. Diese Tiergruppe bestand aus gesunden, geschlechtsreifen Hunden. Eine über die vorhin erwähnten Bedingungen hinausgehende Auswahl (Selektion nach der Art, dem Geschlecht und unter den ausgewachsenen Tieren nach dem Alter) hat nicht stattgefunden. Die Tiere wurden zumindest von der 2. Woche vor der Operation an bis zum Tage der Inanspruchnahme unter gleichen Bedingungen gehalten.

Von den 80 Hunden wurden für Vor- und ergänzende Versuche 20 benutzt, die übrigen 60 in 5 Gruppen zu je 12 Tieren eingeteilt und 7, 20, 26, 33 und 70 Tage nach der Operation für die in vorliegender Mitteilung beschriebenen Versuche verwendet. Die Tötung der Tiere erfolgte teils mit intrakardialer Ätherinjektion, teils durch Nackenschlag und Verblutung. Nach Eintritt des Todes wurde das operierte linke Kniegelenk *in toto* herausgeschnitten,

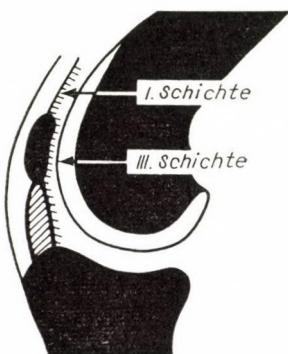


Abb. 1. Schematisches Bild des »Hunde-Halbgelenks«, das die Lokalisation der beiden untersuchten Granulationsgewebsschichten *in situ* zeigt. Die sog. III. Schicht des ursprünglich aus einheitlicher Quelle stammenden Granulationsgewebes haftet an der Knochenwunde des Femur und differenziert sich später knorpelig. Die sog. I. Schicht haftet an der Gelenkkapsel, und in ihr sind keine Anzeichen von Knorpelentwicklung wahrnehmbar

geöffnet, und die zur Untersuchung bestimmten Gewebsteile wurden so rasch als möglich herauspräpariert.

Mit dem Messer isolierten wir das unmittelbar an der Knochenwunde haftende sog. »Gelenkflächen-Granulationsgewebe« (Bezeichnung: III. Schicht) sowie das gleichfalls infolge der Operation entstandene, ebenfalls innerhalb des Gelenks befindliche, an seiner Kapsel haftende Granulationsgewebe (Bezeichnung: I. Schicht). Die topographische Lokalisation der beiden Schichten *in situ* zeigt Abb. 1. (Ausführlichere Angaben über die Entwicklung der Schichten sowie Erklärungen über ihre Bezeichnung siehe [23, 24, 45].)

Nach der Isolierung wurden die größtenteils aus membranartigen Fetzen bestehenden Gewebsschichten sogleich mit der Schere so fein wie möglich zerkleinert. Eine andere Methode kam teils angesichts der geringen Menge des Materials, teils deshalb, weil es sich schwer zerkleinern bzw. nicht zerreiben lässt, nicht in Frage. Das auf diese Weise gewonnene Material wurde auf der analytischen Waage gewogen und dann in ein Warburgsches Gefäß übertragen.

Bei den gegenwärtigen Respirationsuntersuchungen war das Gesamtvolumen 3,2 ml. Die eingemessene Substanzmenge wechselte zwischen 200—400 mg, als Suspensionsflüssigkeit benutzten wir Krebs-Ringer-Phosphatpuffer [54]. Glukose kam in der Konzentration m/100 zur Anwendung. CO<sub>2</sub> ließen wir von 0,2 ml 20%igem KOH absorbieren und nahmen diese Laugenmenge in den diesem Zweck dienenden Glaszyylinder des Gefäßes mit einem gefalteten Filterpapierstreifen auf. (Die Menge von 3,2 ml Gesamtvolumen versteht sich einschließlich der 0,2 ml KOH.) Die Untersuchungen wurden in Anwesenheit von Luftsauerstoff mit einer Schüttelgeschwindigkeit von 70/min nach Verstreichen einer zum Temperaturaustausch bestimmten Zeit von 15 Minuten 3 Stunden lang durchgeführt. Die Ergebnisse stellten wir viertelstündlich fest.

## Ergebnisse

In bezug auf die morphologische Charakterisierung der untersuchten Stadien verweisen wir auf unsere erste einschlägige Mitteilung [23], in der diese Frage eingehend behandelt wurde. Hier erwähnen wir nur die zum Verständnis der Respirationsuntersuchungen wichtigsten Angaben. Am 7. Tage nach der Operation ist in beiden Schichten indifferentes, keinerlei Anzeichen der Knorpelbildung aufweisendes Granulationsgewebe zu sehen. Dieses Stadium ist für uns deshalb wichtig, weil es im Vergleich zu den anderen am besten vaskularisiert ist und genügend jung erscheint, um keine Spuren der Induktionswirkung chemischer Faktoren zu zeigen. (Bei der Wahl dieses Stadiums stützten wir uns auf die Angaben von MARCHAND [40] sowie auf die bei der unter dem Schorf vor sich gehenden Wundheilung gewonnenen Erfahrungen von DÉVÉNYI und HOLZINGER [14]. Bei der Wahl der anderen Stadien gingen wir unter Berücksichtigung der Angaben KROMPECHERS [35, 36, 37, 38] empirisch vor. So konnte festgestellt werden, daß die Gelenkflächen-Granulationsgewebsschicht (III) am postoperativen 20. Tage stark massiv, fibrotisch ist, aber keine knorpligen Formationen enthält. Um den 26. Tag beobachteten wir die ersten frühen Knorpelentwicklungsformen, die sich im Initialstadium der Differenzierung befinden und deren Masse im Vergleich zur Masse der ganzen Gelenkfläche als unbedeutend zu bezeichnen ist. Die anderen Gebiete der III. Schicht zeigen fibrotischen Charakter. Gegen den 33. Tag entwickeln sich charakteristische Gebilde, die als »isolierte Knorpelinseln« bezeichnet werden können. Diese liegen an der Grenze zwischen Spongiosa und Granulationsgewebe und enthalten in gefäßärmer Umgebung verschiedene Knorpelentwicklungsformen, unter denen in relativ größerer Zahl auch bereits reife Knorpelzellen zu beobachten sind. Die Zahl der Inseln war bei den einzelnen Versuchstieren unterschiedlich, und auch in der Ausdehnung weisen sie individuelle Unterschiede auf. Etwa am 70. Tage nach der Operation ist der Verknorpelungsprozeß des Gelenkflächen-Granulationsgewebes bereits ziemlich fortgeschritten. Die vorher isoliert anwesenden Knorpelinseln konfluieren, treten in ständig größerer Ausdehnung in Erscheinung, und ihre Menge hat im Verhältnis zur Masse des ganzen Gelenkflächen-Granulationsgewebes bedeutend zugenommen.

Die an der Gelenkkapsel haftende Granulationsgewebsschicht entwickelt sich in anderer Richtung. Eine knorplige Differenzierung haben wir in dieser Schicht niemals beobachtet, demgegenüber läßt sie sich in den späteren Stadien vom Gewebe der Gelenkkapsel immer schwerer trennen.

Im Zusammenhang mit den Vaskularisationsverhältnissen der morphologisch auf diese Weise gekennzeichneten Stadien müssen wir gleichfalls auf die früheren Mitteilungen verweisen [24, 45].

Die quantitativen Ergebnisse der Respirationsuntersuchungen finden sich in Tabellen 1 und 2.

**Tabelle 1**  
*Respiration der III. Schicht ( $\mu\text{l O}_2/1 \text{ g Trockensubstanz/St.}$ )*

Zwischen Operation und Tötung verstrichene Zeit	Hund Nr.												Durchschnitt	Abweichung vom Durchschnitt	*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
7 Tage	596	545	289	261	252	230	220	187	183	163	74	71	255	133	52%
20 "	867	848	844	838	792	753	752	682	644	627	520	500	722	106	14%
26 "	1063	973	890	855	847	750	730	722	687	670	630	603	785	111	14%
33 "	1240	1118	1058	986	890	810	802	792	740	730	653	550	864	161	18%
70 "	543	538	508	461	390	385	330	325	306	297	277	270	386	85	22%

**Tabelle 2**  
*Respiration der I. Schicht ( $\mu\text{l O}_2/1 \text{ g Trockensubstanz/St.}$ )*

Zwischen Operation und Tötung verstrichene Zeit	Hund Nr.												Durchschnitt	Abweichung vom Durchschnitt	*
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
7 Tage	532	480	449	419	370	340	316	290	280	232	202	158	330	34	34%
20 "	959	940	812	725	650	600	575	468	426	322	250	225	579	201	34%
26 "	1213	1053	1050	1008	990	953	883	880	800	702	617	417	880	164	18%
33 "	1160	930	920	900	893	865	790	790	750	745	605	507	821	122	14%
70 "	818	723	683	664	600	588	553	540	497	388	377	367	568	135	23%

\* Durchschnittliche Abweichung im Prozentsatz des Durchschnitts.

Die Einzelwerte folgen einander in der Reihenfolge ihrer Größe, so daß die identischen Zahlen der III. und I. Schicht innerhalb einer Altersgruppe nicht notwendigerweise die Schichten desselben Tieres bedeuten. Wir führen auch die sich aus den Einzelwerten ergebenden Durchschnittswerte und die sog. Durchschnittsabweichungen an. Darüber hinaus ist angegeben, welchem Prozentsatz des Durchschnittswertes die durchschnittliche Abweichung entspricht.

Wenn wir die Einzelangaben der Tabelle betrachten, so fallen ihre ziemlich großen Schwankungen auf. Diese Erscheinung beruht vermutlich auf folgenden Faktoren:

*Individuelle Unterschiede an den regenerierenden Gelenkflächen der einzelnen Tiere.* Bereits KROMPECHER [36 und persönliche Mitteilung] war es aufgefallen, daß die Regeneration der Gelenkfläche bei wilderen Hunden in derselben Zeit ein größeres Ausmaß zeigte als bei zahmeren Tieren. Diese Erscheinung führt er vor allem auf den rascheren Gebrauch der operierten Extremität, d. h. darauf zurück, daß die mechanischen Faktoren früher zur Geltung kommen. Seine Beobachtungen vermochten auch wir an unserem ziemlich umfangreichen Versuchsmaterial zu bestätigen, indem wir feststellten, daß bei denjenigen Tieren, die ihre operierten Extremitäten nicht spontan benutzten, in der Regel die vollständige Verwachsung der Weichteile zustande kam. In diesen Fällen erschienen die knorpligen Gebilde auch günstigstenfalls verspätet.

*Methodischer Fehler.* In dieser Beziehung muß erwähnt werden, daß die Aufarbeitung der einzelnen Materialien naturgemäß nicht immer nach derselben Zeitspanne erfolgte, und in demselben Sinne ist die verhältnismäßig unvollkommene Methode der Zerkleinerung zu berücksichtigen. (S. im Abschnitt über die Methode und weiter unten.)

Angesichts der Ergebnisse halten wir dennoch eher die individuellen Differenzen für verantwortlich, weil die individuellen Streuungen vor allem in denjenigen Altersgruppen (7 und 70 Tage) zu beobachten sind, in denen die größte Möglichkeit für ihre Manifestation besteht.

Abb. 2 veranschaulicht die Ergebnisse in graphischer Darstellung. Das Liniendiagramm »A« zeigt die durchschnittlichen Atmungswerte der III. und I. Schicht in den einzelnen Zeitpunkten der Untersuchung. Das mit »B« bezeichnete Säulendiagramm bringt eine vergleichende Darstellung, indem wir die Werte beider Schichten am 7. Tage mit jeweils 100% angenommen und errechnet haben, welchen Prozentsatz des 7tägigen Wertes die anderen Stadien repräsentieren. Dementsprechend bringt das Diagramm »B« das abweichende Verhalten der beiden Schichten gleichsam mit einem gemeinsamen Nenner und in relativen Werten besser zum Ausdruck.

Wie aus den Angaben hervorgeht, verbrauchte 1 g Trockengewicht der III. Schicht (Gelenkflächen-Granulationsgewebe) 7 Tage nach der Operation in 1 Stunde 255 Mikroliter Sauerstoff. (Sämtliche im weiteren mitgeteilten Zahlenangaben beziehen sich auf den Sauerstoffverbrauch von 1 g Trockensubstanz während 1 Stunde in Mikroliter.) Von diesem Zeitpunkt an bis zum 33. Tage zeigt das regenerierende Gewebe eine beträchtliche Respirationssteigerung, die besonders anfangs, zwischen dem 7. und 20. Tage (20. Tag 722), sehr bedeutend ist. In den nachfolgenden Stadien nimmt zwar die Respiration weiterhin zu (26. Tag 785, 33. Tag 864), aber in wesentlich schwächerem Maße. Vom 33. Tage an zeigt die Atmung im Vergleich zum vorangegangenen Verlauf eine grundlegende Veränderung: im Verhältnis zu den vorigen Stadien nimmt der Sauerstoffverbrauch stark ab (70. Tag 386). Nach den mit der WILCOXON-

schen Methode durchgeföhrten Berechnungen hat sich die zwischen dem 7. und 20. Tage wahrnehmbare Respirationssteigerung auf der konventionellen 5%igen Wahrscheinlichkeitsebene als signifikant erwiesen. Die vom 20.—26. bzw. vom 26.—33. Tage eingetretene schwächere Respirationssteigerung stellt unter den gleichen Bedingungen keine signifikante Veränderung mehr dar. Die vom 33.—70. Tage zu beobachtende Respirationssenkung ist auf 5%iger Ebene signifikant.

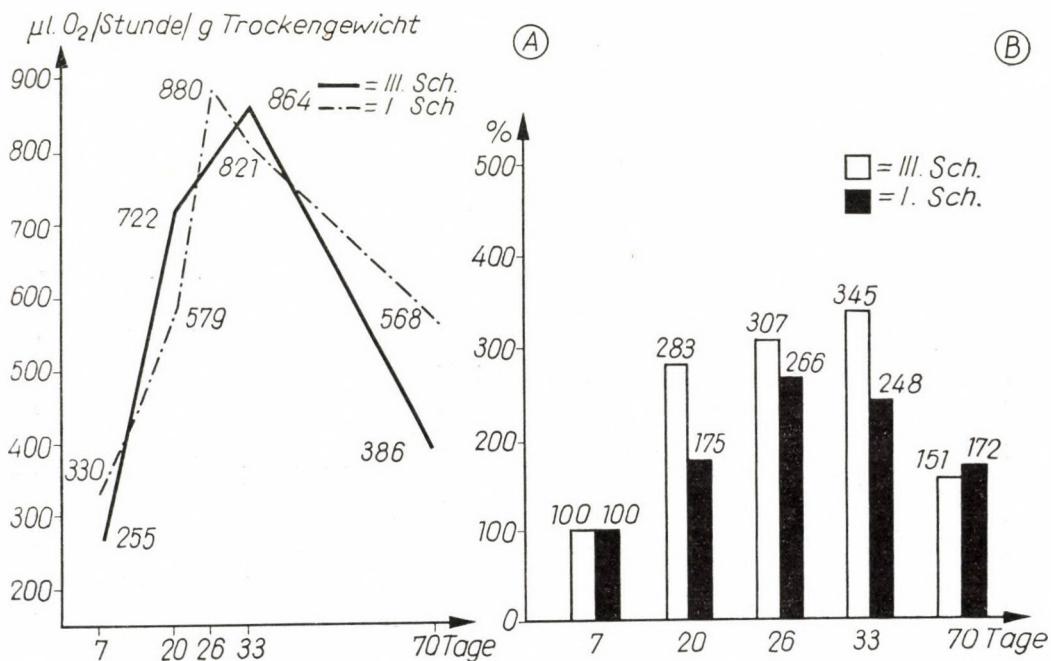


Abb. 2. Graphische Darstellung des Sauerstoffverbrauchs der Granulationsgewebsschichten. A — der zeitliche Verlauf des Sauerstoffverbrauchs. B — Respirationswerte verschiedener Stadien als Perzentile der 7tägigen Werte

Die Atmung des an der Gelenkkapsel haftenden Granulationsgewebes (I. Schicht) hat sich in den untersuchten Stadien folgendermaßen gestaltet: Der am 7. Tage ermittelte Initialwert (330) zeigt zwar später ebenfalls steigende Tendenz (20. Tag 579, 26. Tag 880), aber die Kurve erreicht ihren Höhepunkt am 26. Tage und sinkt von da an allmählich, wenn auch im Vergleich zur III. Schicht in geringerem Maße (33. Tag 821, 70. Tag 586). Nach den Signifikanzberechnungen (WILCOXONSche Methode) ist die zwischen dem 7. und 20. sowie zwischen dem 20. und 26. Tag wahrnehmbare Veränderung auf 5%iger Ebene signifikant. Die sich vom 26.—33. Tage erstreckende Periode der Respirationssenkung ist nicht signifikant, die Senkung vom 33. bis 70. Tage hingegen als signifikant zu betrachten.

Sowohl die in den Tabellen wie die im Diagramm »A« mitgeteilten Angaben entsprechen den Durchschnittswerten der einzelnen Bestimmungen. Wenn wir diese Durchschnittswerte mitteilen, müssen auch einige Tatsachen erwähnt werden, von denen diese Werte offensichtlich beeinflußt werden [1, 19, 55]. Es handelt sich um folgende Faktoren:

1. Anwendung von Äther bei der Tötung der Tiere. Dieses Narkotikum wird ebenso wie die anderen, wenn es in die Zellen eindringt, in ihren Lipoidstrukturen gespeichert und senkt u. a. konsekutiv auch den Sauerstoffverbrauch der Zellen [18, 25, 56]. Bei unseren Untersuchungen waren wir gezwungen, dieses Tötungsverfahren im Interesse einer besseren Vergleichsmöglichkeit mit den früheren Versuchsresultaten anzuwenden, doch nahmen wir zugleich Kontrolluntersuchungen an Tieren vor, die mit Nackenschlag getötet wurden und dann verbluteten, das heißt mit solchen Tieren, die überhaupt kein Narkotikum erhalten hatten. Der Sauerstoffverbrauch der parallel aufgearbeiteten 10 Kontrolltiere war nicht höher als der der mit Äther getöteten Hunde, weshalb wir zu dem Schluß gelangten, daß die Ätheranwendung in unserem konkreten Fall auf die Respirationswerte ohne Einfluß war. Hierfür sprechen auch theoretische Gesichtspunkte, denn die zur Tötung benutzte Äthermenge war weniger als  $\frac{1}{3}$  des Äthergehalts im Blut und in verschiedenen Organen bei tiefer Narkose. Für unser Untersuchungsmaterial ist gerade die Gefäßpauperisation charakteristisch, und im Gegensatz zu den hochdifferenzierten empfindlichsten Geweben enthält es kaum differenzierte, pluripotente Zellen.

2. Das Aufarbeitungsverfahren wurde im Abschnitt »Methode« eingehend beschrieben. Dort teilten wir auch mit, daß die Qualität unserer Materialien die Anwendung einer anderen Methode nicht gestattete. Mit dieser Technik vermochten wir indessen keine gleichmäßig dicken Gewebsschnitte herzustellen, wodurch die Ergebnisse unzweifelhaft beeinträchtigt wurden.

3. Ein beträchtlicher Teil des zur Untersuchung vorbereiteten Materials war bereits vor der Zerkleinerung membranick. Aus diesem Grunde schien es uns ausreichend, die Respirationsuntersuchungen in Anwesenheit von Luft durchzuführen.

Alle diese Gründe veranlaßten uns, die Resultate in erster Linie in zueinander ins Verhältnis gesetzten relativen Einheiten zu untersuchen (Diagramm »B«). In den beiden Schichten ergaben sich folgende Unterschiede:

1. Die Oxydationssteigerung der III. Schicht war größer als die der I. Schicht (20. Tag: III. Schicht 283%, I. Schicht 175%; 26. Tag: III. Schicht 307%, I. Schicht 266%; 33. Tag: III. Schicht 345%, I. Schicht 248%).

2. Der Höhepunkt der Respirationskurve der III. Schicht tritt am 33. Tage, der der I. Schicht am 26. Tage in Erscheinung. Zugleich sei bemerkt, daß die Werte der letzteren Schicht am 33. und 26. Tage einander ziemlich nahestehen.

3. In der III. Schicht ist die Respirationssenkung sowohl absolut wie relativ stärker (70. Tag: III. Schicht 151%, I. Schicht 172%).

Bewerten wir die abweichenden oder übereinstimmenden Züge der Respiration dieser beiden Schichten aus dem Gesichtswinkel der Signifikanzberechnungen, so müssen wir feststellen, daß bei der auf 5%iger Ebene vorgenommenen WILCOXONSchen Berechnung zwischen den 7-, 20-, 26- und 33-tägigen Stadien keine signifikante Differenz zutage tritt. Demgegenüber ist eine signifikante Abweichung zwischen den 70tägigen Stadien zu beobachten.

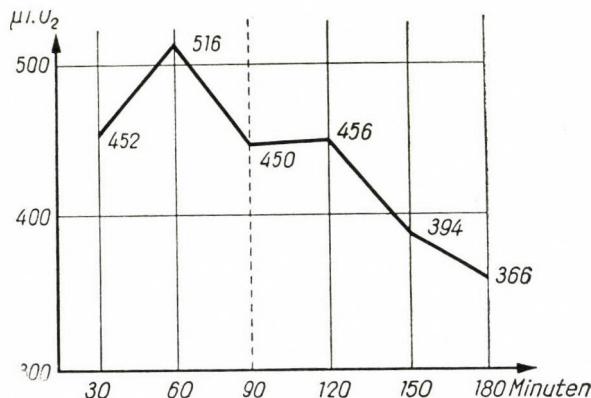


Abb. 3. Durchschnittlicher O<sub>2</sub>-Verbrauch von 1 g Trockensubstanz der 33 Tage alten Gelenkflächenschicht in verschiedenen Untersuchungsstadien

Die zeitliche Gestaltung des Sauerstoffverbrauchs der 33 Tage alten III. Schicht veranschaulicht Abb. 3. Wie das Diagramm zeigt, kam es in den ersten 90 Minuten zur Atmungssteigerung und anschließend zur Senkung. Auf die Erklärung der Erscheinung kommen wir später zurück.

### Besprechung

Als wir die Gewebsatmungsuntersuchungen begannen, erwarteten wir, daß die höchsten Respirationswerte am 7. Tage zu beobachten sein werden. Die vorangegangenen Untersuchungen hatten nämlich ergeben, daß die Vaskularisation und so auch der Kreislauf am 7. Tage das größte Ausmaß zeigt [24] und die aus diesem Stadium stammenden Materialien die geringste Milchsäuremenge enthalten [45]. Wir nahmen an, von diesem anfänglichen Maximalwert ausgehend werden wir stufenweise von Stadium zu Stadium einen immer niedrigeren Respirationswert finden, der sich im Falle der I. Schicht schließlich standardisiert und bei der III. Schicht — wegen der progressiven Entwicklung des Knorpelgewebes — dem Minimum nähert.

Die Untersuchungen haben demgegenüber zu dem Resultat geführt, daß die am 7. Tage festgestellte Gewebsatmung unter sämtlichen untersuchten Stadien den niedrigsten Wert aufwies und die Atmung — wie aus unseren Angaben hervorgeht — am 20., 26. und 33. Tage nach und nach zunahm, und erst am 70. Tage wieder niedrigere Atmungswerte ermittelt wurden. Die Respirationsveränderungen der I. und III. Schicht scheinen — von den im Abschnitt »Ergebnisse« erörterten Faktoren abgesehen — identisch.

Im Zusammenhang mit obigen Darlegungen ergibt sich vor allem die Frage, in welchem Sinne die ziemlich geringe Respiration der 7 Tage alten Materialien gedeutet werden muß. Theoretisch dürften drei Möglichkeiten in Betracht kommen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß der unsrerseits bestimmte Atmungswert die »optimale« Tätigkeit der zur Verfügung stehenden Atmungsfermentsysteme zum Ausdruck bringt. In diesem Fall würde es sich somit weder um eine beschränkte noch um eine gesteigerte Funktion handeln, vielmehr im übertragenen Sinne um einen »Ruhe«-Stoffwechsel. Als eine andere Möglichkeit käme in Frage, daß die Atmungsfermente unter Wirkung gewisser Faktoren in beschränktem Maße funktionieren bzw. — als dritte Möglichkeit — stärkere Tätigkeit ausüben.

Einen Schlüssel zu dieser Frage gibt uns das Problem der Sauerstoffversorgung der Zellen in die Hand. Obschon die Vaskularisationsverhältnisse unter den untersuchten Stadien hier am besten sind, stellt sich die Frage, ob in diesem Regenerationsstadium nicht mit der Möglichkeit gerechnet werden muß, daß Eiweiß zwischen die Kapillar- und Zellwand gelangt (seröse Entzündung RÖSSLE [49], EPPINGER [16, 17]), was für den Sauerstoff die Verlängerung des Diffusionsweges zwischen Kapillar- und Zellwand bzw. eine verringerte Diffusionsmöglichkeit bedeuten würde. Die Atmungskurven der einzelnen Altersgruppen aus den Untersuchungen von KAUNITZ und SELZER [32] können uns in dieser Beziehung Angaben liefern. (Im Koordinatensystem sind an der Abszisse die Bestimmungszeitpunkte, an der Ordinate die Sauerstoffverbrauchswerte dargestellt) Sofern innerhalb der ersten 90 Minuten der Untersuchung Atmungssteigerung, dann eine Senkung ungefähr auf den Ausgangswert zu beobachten ist, muß das als Zeichen des sog. »Sauerstoffschuld« — siehe später — gewertet werden, d. h. es bringt die mangelhafte Sauerstoffversorgung der Zellen zum Ausdruck. Überblicken wir dieses Stadium unserer Untersuchungsmaterialien von diesem Gesichtspunkt, so sehen wir kein auf »Sauerstoffschuld« deutendes klassisches Zeichen. Schließen wir aus dem Verhalten der späteren Stadien (Respirationssteigerung), so scheint weder Nährstoffmangel (Glukose) noch eine Fermentschädigung wahrscheinlich, außerdem ist laut unseren Milchsäureuntersuchungen [45] unter sämtlichen untersuchten Stadien das Gewebsmilieu hier relativ am günstigsten: aus diesen Gründen betrachten wir die Respiration der 7 Tage alten Materialien im gegenwärtigen Abschnitt der Untersuchungen nicht als beschränkt oder gehemmt.

Zur Differenzierung der anderen beiden Alternativen besteht im Rahmen vorliegender Untersuchungen nicht die Möglichkeit.

Eine zweite Frage ist, worauf die ständig zunehmende Oxydationssteigerung der 20, 26 und 33 Tage alten Materialien beruht.

Wenn wir die verschiedenen Möglichkeiten in Betracht ziehen, so muß zuerst die etwaige Erhöhung der Zellzahl in den Granulationsgewebsschichten erwähnt werden. In diesem Fall würde es sich darum handeln, daß im gleichen Gewebsvolumen mit der Zeit größere Zellmengen erscheinen und die vermehrte Zellzahl eine stärkere Atmung produziert. Aus den Mitteilungen von WARBURG und Mitarbeitern [58] sowie NEUHAUS [44] wissen wir, daß die Vermehrung des Zellgehaltes in einem Gewebe — das Wachstum im allgemeinen — unter anderem mit vermehrter Zellatmung einhergeht. Diese Erscheinung darf indessen — unter Berücksichtigung auch anderer Stoffwechselqualitäten — nicht als quantitative Steigerung des sog. Ruhestoffwechsels angesehen werden. Die histologische Untersuchung der einzelnen Stadien hat jedenfalls ergeben, daß die aus späteren Zeiten stammenden Materialien im Vergleich zum 7 Tage alten zellärmer waren und in ihnen beträchtliche Fasernvermehrung zutage trat.

Was die etwaige Rolle der Schilddrüse oder des Vitamins K anlangt [52], so erscheint es unglaublich, daß die zu den Versuchen verwendeten 60 Hunde in Gruppen von je 15 Tieren an einer so ähnlichen Schilddrüsen- bzw. Vitamin K-Störungen gelitten hätten. Was die Schilddrüse betrifft, so müßten die Tiere der einzelnen Gruppen beispielsweise abwechselnd unter Hyper- bzw. Hypofunktionswirkungen gestanden haben.

Es unterliegt keinem Zweifel, daß es sich bei der *in vitro* bestimmten Atmung immer um den sog. »Erregungsstoffwechsel« eines wegen der Aufarbeitung mehr oder weniger lädierten Materials handelt. Es sei indessen darauf hingewiesen, daß die Materialvorbereitung in sämtlichen Stadien auf gleiche Weise erfolgte, weshalb wir glauben, diese Frage bei den relativen Vergleichen vernachlässigen zu können.

Bekannt ist auch die Tatsache, daß die Gewebsatmung im allgemeinen immer schwächer ist als die in reinem Zustand *in vitro* bestimmte Atmungskapazität der Oxydationsenzyme [52]. Die Atmung nutzt somit nicht die totale Kapazität aus, sondern arbeitet gleichsam mit einer Sicherheitsreserve. Für die Intensität der Atmung wäre demnach nicht die Menge der Enzyme verantwortlich. Aus der Literatur kennen wir Angaben, aus denen geschlossen werden darf, daß die Zellen in einzelnen Fällen ihre Lebensfunktion durch bessere Ausnutzung ihrer Atmungskapazität noch fortzusetzen vermögen. So ist z. B. nach den Beobachtungen von WARBURG [57, 58] nach Erhöhung der OH-Ionenkonzentration Atmungssteigerung zu beobachten. Derselbe Autor wies darauf hin, daß das nicht befruchtete Seegelei auf mechanische Schädigung mit 50—70%iger Respirationssteigerung reagiert. Ähnlicher Natur

sind die Feststellungen von RUNNSTRÖM [50] und GERALD und RUBINSTEIN [21], die zu gleicher Zeit mit der durch mechanischen bzw. thermischen Reiz bewirkten Eischädigung Respirationszunahme beobachteten. Nach BROCK, DRUCKREY und HERKEN [7], die obige Angaben auch an Warmblütern bestätigten, führen verschiedene teils chemische, teils mechanische Einwirkungen mitunter zu Stoffwechselsschädigung, deren erstes Zeichen u. a. die Atmungssteigerung ist.

Bei unserem Untersuchungsmaterial sahen wir, vom 7. Tage ausgehend, am 20., 26. und 33. Tage ständig zunehmende Atmung in den Geweben, deren Vaskularisation immer ärmer wurde, deren Zellgehalt relativ abnahm und die immer mehr Milchsäure produzierten. *Unserer Meinung nach handelt es sich bei dieser progressiven Atmungssteigerung um die Manifestation der im obigen Sinne verstandenen, sich nach und nach entfaltenden »Schädigung« beider Schichten.*

Weiterhin ergibt sich die Frage: Welches sind die Faktoren, die bei unseren Materialien die »Schädigung«, d. h. die beschriebene Veränderung der Gewebsatmung, auslösen?

Nach den schon erwähnten Angaben dürften an der Auslösung der Respirationssteigerung verschiedene mechanische bzw. chemische Reizwirkungen beteiligt sein. Es ist daher außerordentlich schwierig, diejenigen Faktoren zu bestimmen, denen in diesem Fall primäre Bedeutung zukommt. Bei früheren Untersuchungen fiel besonders der ständig abnehmende Vaskularisationszustand unserer Materialien in die Augen, den wir für den Sauerstoffmangel im Gewebe verantwortlich machten. Unsere Milchsäurebestimmungen boten eine Stütze für das Vorhandensein dieses Gewebszustandes. Hiernach ist die mangelhafte Sauerstoffversorgung der Gewebe eine sehr auffallende Erscheinung der späteren Stadien. Es stellt sich somit die Frage, ob irgendein Zusammenhang zwischen der verminderten Vaskularisation und der Respirationssteigerung besteht.

Bezüglich der mangelhaften Sauerstoffversorgung der Gewebe liegt es nahe, an die sog. »Sauerstoffschuld« zu denken [26, 15], über die Einzelheiten s. [28, 29, 30, 31, 32, 33, 34]. Diese anfangs an Muskel- und Lebergewebe untersuchte und laut KAUNITZ und SELZER auch für andere Gewebsarten kennzeichnende Erscheinung äußert sich bekanntlich darin, daß die Gewebe infolge Sauerstoffmangel erst in den Zustand der »Zwang-Anoxybiose« gelangen. In diesem Zustand beansprucht das geschädigte Gewebe zur Leistung derselben Arbeit mehr Energie (die Glykolyse verbraucht mehr Zucker). Sofern sie im weiteren Sauerstoff zur Verfügung steht, verbraucht das Gewebe zur Verarbeitung der angesammelten Intermediärprodukte eine größere Sauerstoffmenge. Der Prozeß soll demnach in zwei Phasen vor sich gehen: in der wegen »Anoxybiose« mit Sauerstoffschuld einhergehenden Arbeits- oder Schädigungsphase sowie in der nachfolgenden Restitions- oder Ruhephase, in welcher

das notwendigerweise überkompensierende Gewebe mehr Sauerstoff verbraucht. Diese letztere Phase wäre nach KAUNITZ und SELZER bei den manometrischen Respirationsuntersuchungen wahrnehmbar, wo wir in den ersten 90 Minuten jäh ansteigenden, und sich dann normalisierenden Sauerstoffverbrauch beobachten.

Untersuchen wir die Kurven der einzelnen Altersgruppen in dieser Richtung, so sehen wir, daß sich die 33tägigen Materialien des Gelenkflächen-Granulationsgewebes (III. Schicht) ähnlich verhalten (Abb. 3). (Es sei bemerkt, daß bei dem 20 Tage alten Material derselben Schicht gleichfalls eine ähnliche, aber wesentlich schwächere Veränderung wahrgenommen werden konnte.) Auf dieser Grundlage scheint es, wenn wir unsere Ergebnisse aus dem Gesichtswinkel des Problemenkreises der Sauerstoffschuld untersuchen, daß dieses Gewebe vom 7. Tage an infolge der abnehmenden Vaskularisation in einen ständig schlechteren Zustand gelangt und etwa am 33. Tage, ungeachtet dessen, daß seine Respirationssteigerung (sein Schädigungsstoffwechsel) hier das größte Ausmaß aufweist, in den Zustand der Sauerstoffschuld verfällt. Unter Berücksichtigung obiger Angaben muß somit *angenommen werden, daß die Gefäßpauperisation bzw. die dieser entsprechende verminderte Sauerstoffversorgung der Granulationsgewebsschichten zumindest eine Ursache der bis zum 33. Tage beobachteten Respirationssteigerung darstellt.*

Zugleich sei darauf hingewiesen, daß der typische Verlauf des wahrscheinlich bestehenden »Schädigungsstoffwechsels« — nach den bereits erwähnten Angaben — von Reizwirkungen sehr unterschiedlichen Charakters hervorgerufen werden kann. Es liegt uns fern, dieses Problem in unserem konkreten Fall ausschließlich mit der Gefäßpauperisation bzw. mit der auf dieser beruhenden mangelhaften Sauerstoffversorgung erklären zu wollen. Neben dieser stark in die Augen fallenden Erscheinung spielen wahrscheinlich auch mehrere andere Faktoren als auslösende Ursachen eine Rolle. Als sehr interessante Frage taucht auch das Problem auf, welchen Effekt die auf dem Chemodifferenzierungswege wirkenden Knorpel- bzw. Knocheninduktoren in dieser Beziehung ausüben.

Naturgemäß wäre auch die Frage zu prüfen, worauf sich die Respirationssenkung der Materialien nach dem 33. Tage zurückführen läßt. Als wir die in den vorigen Mitteilungen [23, 45] beschriebenen Vaskularisationszustände im 33- und 70tägigen Stadium der beiden Granulationsgewebsschichten untersuchten, war festzustellen, daß sich der Vaskularisationszustand der Gewebe nicht gebessert, sondern in der III. Schicht sogar verschlechtert hatte. Infolgedessen scheint es, wenn wir nur die sich ähnlich verhaltenden Atmungswerte betrachten, daß es sich um eine auf weiterer Anwesenheit bzw. Progression der schädigenden Faktoren beruhende Respirationsverminderung, d. h. um eine starke Schädigung handelt, die bereits Atmungssenkung herbeiführt [7]. Die »signifikante« Differenz zwischen der Respiration der beiden Granulations-

gewebsschichten am 70. Tage deutet zugleich darauf hin, daß die Verminderung der Vaskularisation zum Ausmaß der »Respirationsschädigung« in Beziehung steht und die ständig fortschreitende Gefäßpauperisation der den Knorpel bildenden III. Schicht stärkere Atmungssenkung zustande bringt als die anfangs verringerte, aber vom 20. Tage an praktisch unveränderte Vaskularisation der I. Schicht.

Bei der III. Schicht muß man auch noch einen anderen Faktor berücksichtigen: das Erscheinen einer relativ größeren Knorpelgewebsmasse. Das reife Knorpelgewebe besitzt sehr geringes Respirationsvermögen [6, 10, 11, 12, 27]. Es verfügt über ein glykolytisches System, aber die Bernsteinsäure- und Zitronensäuredehydrasen sind — obschon anwesend — praktisch inaktiv [20]. Zytochromoxydase hat man nicht gefunden [6]. Obgleich unsere 70-tägigen Materialien keinesfalls als Knorpelgewebe bezeichnet werden können, enthielten sie knorpelartige Gewebeelemente dennoch in beträchtlicher Menge. Der sinkende Abschnitt der Respirationskurve der III. Schicht ließe sich somit auf zwei Faktoren zurückführen: auf den Eintritt des Spätstadiums der Schädigung und auf das Erscheinen einer größeren Knorpelgewebsmasse.

Es muß aber zugleich betont werden, daß wir die Anfangsstadien der Gelenkflächenregeneration untersucht haben. Laut KROMPECHER [37, 38] nimmt die vollständige Regeneration des Hunde-Halbgelenks mit Ausbildung der hyalin-knorpeligen Gelenkfläche etwa 700 Tage in Anspruch. Es liegen zwar im Initialstadium gewisse Abweichungen zwischen den Respirationskurven der beiden Schichten vor, aber diese Unterschiede erklären allein noch nicht das abweichende histologische Verhalten der beiden Schichten. Aus den Respirationswerten der einzelnen Stadien lassen sich daher keine wesentlichen, für die Knorpelbildung bzw. ihre Frühstadien charakteristischen Eigentümlichkeiten feststellen. In dieser Beziehung erwarten wir bessere Resultate von den im Gange befindlichen Methylenblau-Untersuchungen.

Wir sind uns darüber im klaren, daß noch zahlreiche weitere Probleme (Untersuchung der Funktion des Atmungsfermentssystems, der Nährstoffversorgung, der anaeroben und aeroben Glykolyse) zu lösen sind, mit denen wir uns gegenwärtig beschäftigen. Alle diese Angaben sind erforderlich, um den Stoffwechselproblemen der regenerierenden Gelenkfläche und des neu gebildeten bzw. in Entwicklung befindlichen Knorpelgewebes näherzukommen.

Für die Durchführung der Signifikanzberechnungen sei Dr. B. GYIRES, Professor für Wahrscheinlichkeitsrechnung und Angewandte Mathematik an der Kossuth-Universität in Debrecen, auch an dieser Stelle bestens gedankt.

## LITERATUR

1. AEBI, H. (1950) Kationenmilieu und Gewebsatmung. *Helv. Physiol. Acta*, **8**, 525—545.
2. ALTMANN, H. W. (1949) Über Leberveränderungen bei allgemeinem Sauerstoffmangel nach Unterdruckexperimenten an Katzen. *Frankf. Z. Path.*, **60**, 376—494.
3. AXELROD, D. R., PITTS, R. F. (1952) Effects of hypoxia on renal tubular function. *Journ. Appl. Physiol.*, **4**, 593—601.
4. BECKER, V., RIEKEN, E. (1954) Histologische und manometrische Untersuchungen über die Zellatmung in der Niere. *Virchows Arch.*, **323**, 1—14.
5. BECKER, V. (1954) Geweblich gebundener Sauerstoffmangel. (Histotoxisch bedingte Hypoxydosis.) *Klin. Wschr.*, **32**, 577—584.
6. BOYD, E. S., NEUMANN, W. F. (1954) Condroitin sulfate synthesis and respiration in chick embryonic cartilage. *Arch. Biochem. Biophys.*, **51**, 475—486.
7. BROCK, N., DRUCKREY, H., HERKEN, H. (1938) Der Stoffwechsel des geschädigten Gewebes. II. Nach Untersuchungen am Seeigelei. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper. Path. Pharmakol.*, **188**, 436—450.
8. BÜCHNER, F. (1944) Verhandl. Dtsch. Ges. Path. Breslau, 20. [zit. 5].
9. BÜCHNER, F. (1956) Allgemeine Pathologie. II. Aufl. Urban und Schwarzenberg, München—Berlin.
10. BYWATERS, E. G. L. (1936) Metabolism of cartilage. *Nature*, **138**, 30—31.
11. BYWATERS, E. G. L. (1936) Metabolism of cartilage. *Nature*, **138**, 288.
12. BYWATERS, E. G. L. (1937) The metabolism of joint tissues. *Journ. Path. Bact.*, **44**, 247—268.
13. DÉNES, G., SZÉKELY, M. (1958) Manometriás mérőmódszerek. (Manometrische Meßmethoden.) KOVÁCH, A.: A kísérletes orvostudomány vizsgáló módszerei. Die Untersuchungsmethoden der experimentellen Medizin. Akadémiai Kiadó, Budapest, **4**, 423—558. (Ungarisch.)
14. DÉVÉNYI, I., HOLZINGER, L. (1954) The morphology of wound healing under crusts. *Acta Morphol. Hung.*, **4**, 447—461.
15. DURING, A., ZUNTZ, N. (1913) Die Nachwirkung der Arbeit auf die Respiration in großen Höhen. *Skand. Arch. Physiol.*, **29**, 133—148.
16. EPPINGER, H. (1936) Die Sauerstoffversorgung des normalen und pathologischen Gewebes. *Ergebn. Inn. Med. u. Kinderheilk.*, **51**, 185—217.
17. EPPINGER, H. (1938) Über Ermüdung, Entzündung und Tod. *Zeitschr. Klin. Med.*, **133**, 1—35.
18. FAHRIG, C. (1927) Über den Kohlenhydratumsatz der Geschwülste und ihrer normalen Vergleichsgewebe sowie seine Beziehungen zum Milchsäurehaushalt des Körpers. *Z. Krebsforsch.*, **25**, 146—228.
19. FISCHER, H., HUBER, P., LANGEMANN, H. (1951) Die Atmung von Herzmuskel schnitten unter dem Einfluß herzaktiver Glykoside nebst kritischen Bemerkungen zur Verwendung von Gewebschnitten in der Warburg-Apparatur. *Helv. physiol. Acta*, **9**, 416—437.
20. FOLLIS, R. H. JR., BERTHRONG, M. (1949) Histochemical studies on cartilage and bone; normal pattern. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **85**, 281—298.
21. GERALD, RUBINSTEIN, (1934) [zit. 19].
22. GRAHAM, G. K., LAFORET, E. G. (1952) An electrocardiographic and morphologic study of changes following ligation of the left coronary artery in human beings: a report of two cases. *Amer. Heart Journ.*, **43**, 42—52.
23. HADHÁZY, Cs., OLÁH, É. (1958) Untersuchungen über die Knorpelbildung. I. Problemstellung und allgemeine histologische Untersuchungen unter Neodifferenzierungsverhältnissen. *Acta Biol. Hung.*, **9**, 139—158.
24. HADHÁZY, Cs., KOSTENSZKY, K., OLÁH, E. (1959) Untersuchungen über die Knorpelbildung. II. Vaskularisationsverhältnisse bei der Gelenkbildung. *Acta Biol. Hung.*, **9**, 271—283.
25. ISSEKUTZ, B. (1951) Gyógyszertan, méregtan és gyógyszerrendelés. Pharmakologie, Toxikologie und Rezeptur. Tankönyvkiadó, Budapest. (Ungarisch.)
26. HILL, A. V. (1926) Muscular activity. Baltimore.
27. HILLS, G. M. (1940) The metabolism of articular cartilage. *Biochem Journ.*, **34**, 1070—1077.
28. KAUNITZ, H., SELZER, L. (1937) Hemmt Milchsäure die Muskelermüdung? *Klin. Wschr.*, 1358—1360.
29. KAUNITZ, H., SELZER, L. (1938) Über die Bedeutung der Milchsäure für das »O<sub>2</sub>-Debet« des überlebenden, mit Monojodessigsäure vergifteten, nicht ermüdeten und ermüdeten Muskels. *Z. exper. Med.*, **102**, 356—360.
30. KAUNITZ, H., SELZER, L. (1938) Über die Bedeutung von Veränderungen der »gerichteten

- Permeabilität des Mineralstoffwechsels und der Milchsäure für die Muskelermüdung. *Z. exper. Med.*, **102**, 308—348.
31. KAUNITZ, H., SELZER, L. (1938) Über Veränderungen des Sauerstoffverbrauches und des Mineralstoffwechsels der Leber bei Ermüdung. *Z. exper. Med.*, **102**, 349—355
  32. KAUNITZ, H., SELZER, L. (1938) Respirationsversuche über den Sauerstoffbedarf bei verschiedenen, mit seröser Entzündung einhergehenden Gewebsschädigungen. *Z. exper. Med.*, **103**, 643—653.
  33. KAUNITZ, H., SELZER, L. (1938) Über den Einfluß des  $O_2$ -Mangels auf den  $O_2$ -Verbrauch des überlebenden Gehirns, Muskels und der Leber. *Z. exper. Med.*, **103**, 654—663.
  34. KAUNITZ, H., NEUGEBAUER, R., SCHWEIGER, E. (1938) Über den Histamingehalt der Organe bei seröser Entzündung. *Z. exper. Med.*, **103**, 627—637.
  35. KROMPECHER, ST. (1956) La régénération et néoformation experimentale des articulations. *C. R. Ass. Anat.*, 813—821.
  36. KROMPECHER, ST. (1956) Die Beeinflußbarkeit der Gewebsdifferenzierung der granulierenden Knochenoberflächen, insbesondere die der Callusbildung. *Langenbeck's Arch., Dtsch. Z. Chir.*, **281**, 472—512.
  37. KROMPECHER, ST. (1958) Die qualitative Adaptation der Gewebe. *Z. mikr. anat. Forsch.*, **64**, 59—99.
  38. KROMPECHER, ST. (1958) A szövetdifferenciálódás kísérletes befolyásolása, különös tekintettel az izületképzésre. Experimentelle Beeinflussung der Gewebsdifferenzierung, unter besonderer Berücksichtigung der Gelenkbildung. *Magyar Tud. Akad. Biol. Csop. Közl.*, **1**, 81—103 (Ungarisch.)
  39. LOEBEL, R. O. (1925) Beiträge zur Atmung und Glykolyse tierischer Gewebe. *Biochem. Ztschr.*, **161**, 219—239.
  40. MARCHAND, F. (1901) Der Prozeß der Wundheilung. Enke-Verlag, Stuttgart.
  41. NETTER, H. (1949) Zur Energetik der stationären chemischen Zustände in der Zelle. *Naturwiss.*, **4**, 260—267.
  42. NETTER, H. (1949) Die Feinstruktur der Zelle als dynamisches Phänomen. *Verhandl. Dtsch. Ges. Path.*, **33**, 8—18.
  43. NEUHAUS, C. (1929) Wachstum und Stoffwechsel. *Dtsch. Med. Wschr.*, **55**, 691—693.
  44. NEUHAUS, C. (1930) Über den Stoffwechsel des Granulationsgewebes (Atmung und Glykolyse). *Beitr. path. Anat.*, **83**, 383—430.
  45. OLÁH, É., HADHÁZY, Cs., KOSTENSKY, K. (1959) Untersuchungen über die Knorpelbildung. III. Hämoglobin- und Milchsäuregehalt der regenerierenden Gelenkfläche in verschiedenen Regenerationsstadien. *Acta Morph. Hung.*, **9**, 45—61.
  46. OPITZ, E. (1948) Über die Sauerstoffversorgung des Zentralnervensystems. *Naturwissenschaft.*, **35**, 80—88.
  47. OPITZ, E. (1949) Der Zellstoffwechsel in seiner Beziehung zur Zellstruktur. *Verhandl. Dtsch. Ges. Path.*, **33**, 18—36.
  48. ROTTER, W. (1949) Über die Bedeutung der Ernährungsstörung, insbesondere des Sauerstoffmangels für die Pathogenese der Gefäßwandveränderungen, mit besonderer Berücksichtigung der Endarteritis obliterans und der »Arteriosklerose«. Zugleich ein Beitrag zum Entzündungsproblem. *Beitr. path. Anat.*, **110**, 46—102.
  49. RÖSSLE, R. (1943) Über die serösen Entzündungen der Organe. *Arch. Path. Anat.*, **311**, 252.
  50. RUNNSTRÖM, I. (1932) Die Beeinflussung der Atmung und Spaltung im Seeigelei durch Dimethylparaphenylenamin und Hydrochinon. *Protoplasma*, **15**, 532—565.
  51. SOLBACH, A. (1941) Über die frühesten morphologischen Veränderungen am Herzmuskel infolge von akuter Coronarisinsuffizienz; Untersuchungen an Kaninchenherzen. *Frankf. Ztschr. Path.*, **55**, 159—167.
  52. STRAUB, F. B. (1960) Biochemie. Akadémiai Kiadó, Budapest.
  53. STRUGHOLD, H. (1944) Hypoxydose. *Klin. Wschr.*, **23**, 221—222.
  54. UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H., STAUFFER, I. F. (1957) Manometric Techniques. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
  55. VOGEL, G. (1954) Über den Einfluß des Blutserums auf die Gewebsatmung. *Virchows Arch.*, **325**, 710—722.
  56. WARBURG, O. (1914) Über die Empfindlichkeit der Sauerstoffatmung gegenüber indifferenten Narkotika. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, **158**, 19—28.
  57. WARBURG, O. (1914) Zellstruktur und Oxydationsgeschwindigkeit nach Versuchen am Seeigelei. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, **158**, 189—208.
  58. WARBURG, O. (1926) Über den Stoffwechsel der Tumoren. Springer Verlag, Berlin.

### INVESTIGATIONS OF CHONDROGENESIS

#### IV. Respiration of tissue forming on the regenerating articular surface at different stages of the regeneration

In continuation of earlier experiments, investigations into the respiration of tissues were made with the aid of Warburg's technique. After removing the articular surface of the distal femur-end in 80 dogs (KROMPECHER—PUKY's operation), the granulation tissue growing on the surface of the knee joint and that adhering to the joint capsule were examined on the 7th, 20th, 26th, 33rd and 70th day after the operation. While signs of chondrogenesis could be demonstrated in the granulation tissue growing on the articular surface, no such signs were observed in the layer covering the capsule.

Examinations gave the following results. Values of respiration of the superficial granulation tissue ( $\mu\text{l}$  of oxygen/hr/g of dry matter): 7th day, 255; 20th day, 722; 26th day, 785; 33rd day, 864; 70th day, 386. The corresponding values for the granulation tissue adhering to the joint capsule were 330, 579, 880, 821 and 586. Represented graphically, the two curves show certain differences. That of the superficial layer is steeper and reaches its peak on the 33rd day, while that of the capsular layer shows a maximum on the 26th day. Decrease in respiration on the 70th day is more pronounced in respect of the surface layer than in that of the granulation tissue applied to the capsule.

Discussing these results, authors reach the conclusion that a »lesional« metabolism is developed, and that the ascending branch of the curves indicates increasing oxidation due to it. The descending leg of the respiration curves indicates decreasing oxidation presumably due to progressive impairment and, in the case of the granulation tissue growing on the articular surface, also to the development of a relatively large amount of cartilaginous tissue. The authors regard progressive vascular pauperization as a factor responsible for the lesion, though it is but one of several factors.

### ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ОБРАЗОВАНИЮ ХРЯЩЕЙ

#### IV. Способность регенерирующейся поверхности к тканевому дыханию в различных фазах регенерации

В продолжении своих прежних исследований авторы проводили на 80 собаках опыты по тканевому дыханию при помощи Варбургской техники. Экспериментальным материалом служила поверхность регенерирующегося коленного сустава собак. После удаления суставной поверхности дистального бедра (полусустав по Кромпехер—Пуки), образующаяся здесь грануляционная ткань суставной поверхности, далее прилипающая к суставной сумке часть грануляционной ткани исследовалась на 7., 20., 26., 33. и 70. день после операции. Гистологическая обработка показала в грануляционной ткани суставной поверхности образование хрящей, в то время как в другом исследованном слое такого изменения не наблюдалось.

Результаты исследований следующие: величины дыхания расположенной на суставной поверхности грануляционной ткани (в величинах микролитр кислорода/час/сухого вещества): 7. день — 255, 20. день — 722, 26. день — 785, 33. день — 864, 70. день — 386. Величины дыхания слоя грануляционной ткани, прилипающегося к суставной сумке, выраженно по вышеуказанному: 7. день — 330, 20. день — 579, 26. день — 880, 33. день — 821, 70. день — 586. Кривые дыхания, составленные на основе графического изображения вышеприведенных цифровых данных двух исследованных слоев показывают при сравнении друг с другом следующие отклонения: повышение дыхания грануляционной ткани на суставной поверхности, как правило, большего размера, его максимум наблюдается на 33. день. Максимальное повышение дыхания слоя грануляционной ткани, прилипающейся к суставной сумке, наблюдается на 26. день. Снижение дыхания слоя суставной поверхности, измеренное на 70. день, большего размера, чем в случае другого исследованного слоя.

При обсуждении результатов авторы считают вероятным, что в данном случае оформляется обмен веществ «повреждения», и они приписывают восходящую ветвь кривой дыхания повышению окисления, возникающему в результате этого обмена веществ. Нисходящая ветвь кривых дыхания, то есть снижение окисления около 70. дня, по мнению авторов, является последствием прогрессирующего повреждения, и в случае грануляционной ткани суставной поверхности кроме того и последствием образования большей массы хрящевой ткани. По предположению авторов вызывающим повреждение фактором является — по крайней мере частично — прогрессирующее обеднение сосудами, однако, они этому явлению не приписывают исключительной роли.

ÉVA OLÁH, Debrecen 12, Anatomia, Ungarn.

CsABA HADHÁZY, Debrecen 12, Anatomia, Ungarn.

KATALIN KOSTENSZKY, Debrecen, 12, Anatomia, Ungarn.



# REGENERATION AND SOMATIC EMBRYOGENESIS IN THE CALCAREOUS SPONGE *LEUCOSOLENIA COMPLICATA* MENT.

G. P. KOROTKOVA

DEPARTMENT OF ANIMAL EMBRYOLOGY, STATE UNIVERSITY OF LENINGRAD (HEAD: B. P. TOKIN)

(Received May 2, 1960)

## Summary

Vital observations were carried out on regeneration processes in the calcareous sponge *Leucosolenia complicata* under various experimental conditions. The experiments have been performed on oscular tubes (of about 1 mm size in diameter) excised from the colony together with a small part of the stolon. The types of operation were as follows: 1. Excision of small pieces from the wall of the oscular tube (250 operations); 2. Cutting off the apical part of the oscular tube (62 operations); 3. Cutting off the basal part of the oscular tube (50 operations); 4. Longitudinal incision of the apical end of the oscular tube (20 operations); 5. Sectioning of the wall of the oscular tube into pieces of about 1–2 mm size in diameter (two sets of experiments); 6. Punctured burns (130 operations). The oscular tube has regenerated the normal structure of its wall after excision of pieces and punctured burns. Analogous process was observed on the wound-surfaces produced by cutting off the oscular tubes from the stolon. Sponges having been treated as in experiments 1. and 2. formed — after having regenerated — buds on places of the injuries (after excisions in 25% and after burns in 40–60% of cases). After having cut off the apical part of the oscular tube, an osculum of typical structure was regenerated in 10–15% of cases. However, sponges with removed apical and basal ends transformed, in general, into stolon-like formation. In 30% of cases (in the experimental set 4), we obtained the doubling of ends of the oscular tubes as a result. Small pieces cut out from the wall of the oscular tube developed into miniature sponges easily coalescing with one another and forming colonies with one osculum, or with several oscula. On the basis of these experiments and the literary data, it can be stated that in sponges the morphogenetic processes of the somatic embryogenesis predominate, however, the phenomena of the true regeneration can manifest themselves too.

## Introduction

Recently the discussion about the evolution of the regenerative phenomena started anew [31, 32, 35, 36 and others]. Since the solution of this problem is of a great practical and theoretical importance, a clear concept of the regenerative capacity of the different animal groups is needed. In this connection, lower forms as e. g. the sponges, existing on a very primitive degree of integration have, without doubt, special interest. BEKLEMISHEV [3] gives a very appropriate characterization of the sponges: "The sponge individual of the colony loses easily its individuality, for that very reason, because this individuality is of a very low grade" and further: "In all sponges, the individuality of an individual, as well as that of the colony remains on a low level and any progress is, in this connection, of no significance in all types of sponges."

Many zoologists, as *e. g.* BEKLEMISHEV, regard sponges with several oscula as colonies, and each osculum with its contributing body part as an individual.

Having analysed data found in literature and those of our own investigations, we also consider the organization of the sponges according to the conceptions exposed above.

The majority of the authors considers the regenerative capacity of the sponges to be as unlimited. They are supported by the well-known facts of developing sponges from somatic cell-complexes after their dissociation. This phenomenon was first observed by WILSON [39], in the case of the siliceous sponge *Microciona prolifera*, and was later investigated chiefly on colony-forming siliceous sponges [27, 12 and others], as well as on calcareous sponges [16, 17]. In spite of many works dealing with this problem, certain question still remain to be elucidated: *e. g.* the character of the cell-complexes formed after dissociation of conglomerates; the grade of dedifferentiation of the different cell-types etc.

Having thoroughly studied the literature dealing with the development of new sponges from cell aggregations, we are convinced that the morphogenetic processes resulting in the new-formation of all structures of the sponge, have very close relations to those observed on sponges developing from gemmulae, or on other forms of the asexual reproduction. These processes have, naturally, their specific features too.

The development of sponges from reduction bodies formed in the body of the sponge under different unfavourable conditions has, in this connection, special interest [28]. Also the facts published by BURTON [7] are interesting. In possession of a great number of little *Geodia barretti* with various irregular form, the idea occurred to this author, whether these sponges could not originate by the same way under natural conditions, as sponges develop from cell aggregations produced by squeeze in the course of an experiment. He succeeded in producing experimentally little specimens of *Geodia*, after having squeezed sponge bits through a fine-meshed cloth. After making a comparison between the numerous features of sponges produced by experimental way, and those of sponges found in the nature, the author states their similarity, and comes to the conclusion that there is a possibility for a special form of asexual reproduction by way of a natural production of "regenerative cell masses".

It may be supposed with good reason that by squeezing a sponge through the fine pores of a thick cloth, or when taking otherwise tissue fragments of microscopic size, we establish, experimentally, those conditions, which can be found also in the nature, where they lead to asexual reproduction.

TOKIN [32] proposes for similar groups of phenomena to be united by the term "somatic embryogenesis". Any form of asexual reproduction elicited experimentally (somatic embryogenesis) differs fundamentally from processes

of the true regeneration (*i. e.* the new-formation of any part or organ of the body). In the first case, the morphogenesis is preceded by profound transformations, or by the full loss of tissue, organ, or other structures. Processes of the true regeneration are characterized by conservation of typical structural features of the rest of an organ, or of the body.

Taking in consideration the idea about resemblance between morphogenetic processes in sponges developing from experimentally (by way of dissociation) isolated cells or cell aggregations, and those of the asexual reproduction, and accepting the new classification of the regenerative phenomena, one must acknowledge that, according to most literary data, sponges can develop into whole organisms from somatic cells, *i. e.* they manifest a development of the type of somatic embryogenesis. The sponges can reproduce under natural circumstances, by way of various forms of the asexual reproduction. According to TOKIN [32], this characteristic of the sponges is related to their low grade of integration.

By analysing the phenomena of the true regeneration, the paradoxical fact appears that we possess only very few reliable data on the mechanism of this phenomenon and its distribution among sponges.

According to certain data, sponges can regenerate various structures of their body after having been wounded by animals (*e. g.* by larvae of *Trichoptera*, boring ways into the tissues of fresh-water sponges [29]).

WELTNER [37] and VAN TRIGT [34] have sectioned out small pieces of the body of fresh-water sponges and observed, on living objects, the new-formation of the dermal membrane and of the osculum. These works, however, were not completed with thorough histological examination, without which it is difficult to establish the nature of the regeneration processes.

GANIN [14] who has not dealt with special questions of the regeneration, published many interesting observations, according to which, a portion cut out of the sponge has the capacity "to heal its wounds" by way of multiplying its cell elements.

WELTNER [38], having studied the new formation of lost body parts on *Ephydatia fluviatilis*, concluded that the archaeocytes are of a great importance in the regeneration processes.

LIEBERKÜHN [21, 22], METSCHNIKOFF [24, 25] and WELTNER [38] have observed the phenomenon of reduction of the flagellated chambers in sponges living through the winter, as well as their new formation from amoebocytes, in spring.

MAAS [23] has observed in *Chondrosia reniformis* that fragments cut out from various body regions can regenerate the sponge. Histological examination showed profound destructive changes and total loss of all structures characterizing the given sponge type having preceded the morphogenetic processes. The author believes the *Chondrosia reniformis* to be devoid of all

regenerative capacities and speaks about a rearrangement of cell elements already existing into new organs of the sponge. MAAS has observed, without doubt, a phenomenon of the somatic embryogenesis.

In the work of BRØNDSTED [5] incontestable evidence can be found as to the regenerative properties of the fresh-water sponge *Spongilla lacustris*. The author, after having detached the sponges developing from gemmulae from the substratum, at different developmental periods, has transposed them on another place. After attachment of the sponges, the building of a new basal epithelium was examined. It has been found that fully developed sponges can regenerate their basal epithelium on one occasion; after having been separated again from the substratum, they regenerate their basal epithelium in 50% of cases only. The less developed the sponge was, the more often was the basal epithelium found as repeatedly regenerated (e. g., six times in sponges having been detached from the substratum shortly after the stretching out of the cells on the surface). Histological examination of sections made from fixed sponges showed that in early stadia of development from gemmulae, the archaeocytes are transformed into typical cells of the basal epithelium, which are characterized by a flattened form and a strongly vacuolated protoplasm. The basal epithelium regenerated repeatedly, contains elements showing the features of an incomplete differentiation. According to the author, the decrease of regenerative power parallel with the progressing development of the sponges, bears a relation to the diminution of the reserve of "embryonic, undifferentiated" cells, i. e. to that of archaeocytes. Passing by opinions of the author as for the mechanism of the regeneration process, we only want to stress the fact that the fresh-water sponges can regenerate their basal epithelium in a very restricted measure and, in cases of repeated operations, the regeneration either fails to come about, or it takes its course defectively.

JONES [18] has published in his work results of observations on plates sectioned out from the body of *Leucosolenia complicata*. The author studied the phenomenon, in the course of which the excised cell plate curves in, by means of the contractility of some cell elements of the sponge, and an oscular tube will be regenerated. The author has observed that, between the borders of the fragment curved in like a groove, it forms a two-layered cell membrane and, as a result, a sponge of normal structure regenerates. Observations of JONES [18] were, however, limited to a period of about a week, and the author did not set as special goal to investigate the laws of the regeneration process itself.

This short survey of literary data, which had to be carried out by necessity clearly shows that the authors had given preference to developmental processes of sponges developing from dissociated cells and, further on, that the data concerning other regeneration processes are very incomplete.

It seemed as interesting to investigate, how the sponges can regenerate

parts of the dermal membrane, or pieces of the osculum and of the canal-system etc., taking in consideration the ideas mentioned above about the necessary delimitation of processes of the true regeneration and of the somatic embryogenesis, as well as the ideas exposed in the introduction of our paper about organization of the sponges.

Further on, we mean to compare the mechanisms of the new-formation processes under conditions of various experimental influences, in order to solve the problem of interrelations of the regeneration phenomena and somatic embryogenesis in sponges of different grades, as to the complexity of their organization.

We had already published [19] results of our vital observations on regeneration processes of the fresh-water sponges *Spongilla lacustris* and *Ephydatia mülleri*. On the basis of results of these observations, as well as according to the literary data, it may be thought that in the fresh-water sponges phenomena closely related with asexual reproduction, as well as typical regeneration processes occur. We have observed the regeneration of the oscular tube and of parts of the dermal membrane on sponges of 20 to 25 days (after hatching from the gemmulae). Regeneration of parts of the oscular tube and of the dermal membrane proceeds very quickly, in a day or two. At the same time, we have succeeded in provoking the new-formation of oscular tubes, by means of using punctured burns injuring their basis. Larvae of fresh-water sponges do not regenerate at all after having been cut into two or more parts, however, each fragment of the larva can transform itself into a sponge of small size. In comparison with the control (non-operated) larvae, the attachment and the metamorphosis of the operated ones were considerably retarded.

In this paper we are dealing with vital observations on the regeneration of the calcareous sponge *Leucosolenia complicata* MENT. The sponges were classified by V. M. KOLTUN for which we express our gratitude to him.

Subsequently we shall publish results of vital observations on the regeneration of other sponge species, as well as of histological examinations made on regenerating sponges on the one hand, and on sponges developing by way of somatic embryogenesis, on the other hand.

### Material and methods

*Leucosolenia complicata* MENT. has the form of small branching tubes spreading over the substratum. From the basal tubes, in various places of the colony, vertical tubes are branching off with an osculum on their ends. These oscular tubes can reach a length of 10 mm, their thickness varying between 0.5 and 2 mm. The osculum is surrounded by a characteristic wreath of spicules and the adjacent tube-region does not contain choanocytes. The skeleton consists of uniradiate and quadriradiate spicules [2, 15].

*L. complicata* can be found in large quantities on the littoral zone of the Barents-Sea. This sponge species, as well as other representatives of the genus *Leucosolenia*, manifests a high sensitivity to changes in the environmental conditions. Therefore, we only used freshly-collected material for the experiments. The sponges were held either in the sea, or in the

laboratory in a great aquarium filled with sea-water. The operated sponges were immediately placed into the sea-water. At higher temperatures of the water, or under other unfavourable conditions, the choanocytes have lost their flagellae and collars and transformed into amoeboid cells. Analogous phenomena have been observed by other authors too [26, 33, 6 and others]. After having replaced the sponges into fresh sea-water, the functions of the choanocytes were reestablished. Oscular tubes having a diameter no smaller than 1 mm were chosen for the experiments. These were cut off from the rest of the colony with a little part of the adjoining network of the basal tubes.

We have performed the following types of operations:

1. Excision of small pieces from the wall of the oscular tube (250 operations).
2. Cutting off the basal part of the oscular tube (62 operations).
3. Cutting off the basal part of the oscular tube (50 operations).
4. Longitudinal incision of the apical end of the oscular tube (20 operations).
5. Cutting of the wall of the oscular tube into pieces of about 1 to 2 mm in diameter (two sets of experiments).
6. Punctured burns (130 operations).

The operated sponges were placed into small glass vessels covered with gauze and then were put in the sea. In the course of the experiments, the temperature of the sea-water was controlled. Vital observations were carried out every day. In addition, part of the experimental sponges were fixed for further histological investigations.

The experiments were carried out in June and July, 1958 and 1959 at the observatory of the marine biological institute of the Academy of Sciences of the USSR in Murmansk.

Here I wish to express my deep gratitude to director M. M. KAMSHILOV who made it possible to conduct our studies in this institute.

## Results

### *Excision of small pieces from the wall of the oscular tube (1st type of operation)*

“Wound-healing” was observed in all operated sponges proceeding the more rapidly, the smaller the lesion was. The size of the pieces sectioned out was 1 mm<sup>2</sup> on the average. The complete healing required 8–10 days at a temperature of 4–6° C of the sea-water and 6–7 days at 8–9° C. The regeneration process took its course, in general, similarly in all cases. Fig. 1 shows the scheme of the wound-healing process. At the end of the first day after operation, the appearance of a two-layered transparent cell-membrane was observed in the angles of the wound. In 2 to 3 days, this membrane would cover the whole opening in the body wall of the sponge. In 4, 5 or 6 days, a layer of choanocytes is growing gradually, on the inner surface of the regenerate, from the borders of the wound towards the centre. In the course of the same time and the following days, pores appear in the regenerate and a skeleton will be produced.

In cases when the borders of the wound have got near to each other after operation, the cell-membrane forms at the beginning of the regeneration quickly connects the wound-borders and then the regeneration will be finished considerably sooner (in 3–4 days); on the wound-place remains, however, a more or less deep groove and the whole tube curves in at the side, where the cutting was made (Fig. 2).

In a set of the experiments, 30 operated sponges were left for vital observation to be made during a longer period (22 days). In 7 cases (about

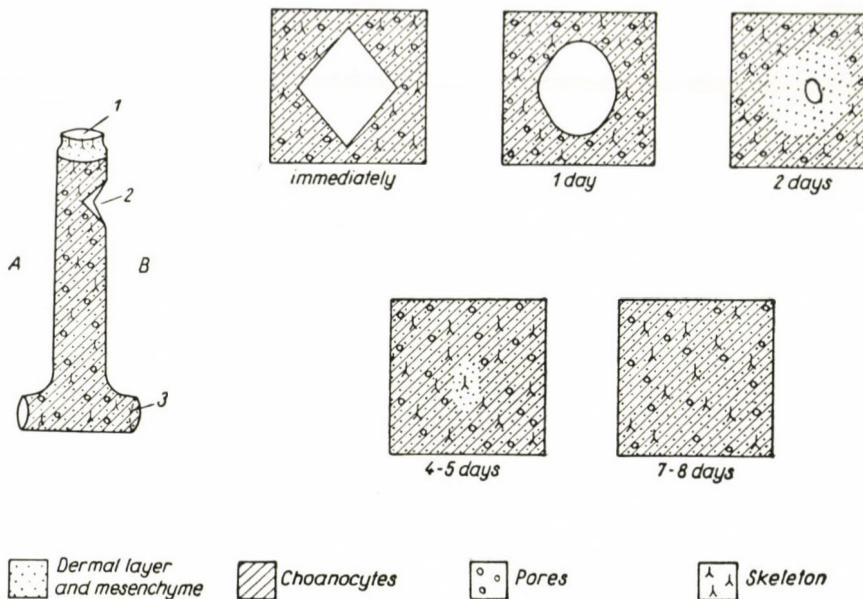


Fig. 1. "Wound-healing" after excision of parts from the body wall of the sponge. Average regenerative periods at a temperature of 5–6°C are given. A — Scheme of the regeneration. 1 — osculum, 2 — excision, 3 — part of the stolon. B — Scheme of the following changes in the wound-region during regeneration

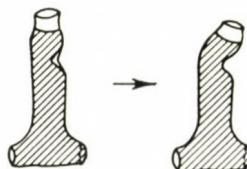


Fig. 2. Defective "wound-healing". In Fig. 2 as well as in the others, the regions of the sponge are marked with lines where the layer of the choanocytes is to be found

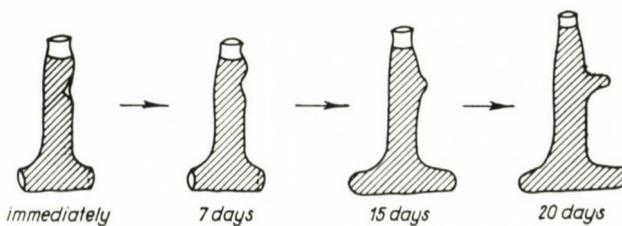


Fig. 3. Bud-formation on the wound-place

25%) one swelling or two were formed on the wound-place in the course of the 12 to 15th days. Subsequently, these swellings grew up and transformed into lateral buds, *i. e.* into rudiments of new tubes (Fig. 3). At the same time, each oscular tube has elongated and the openings of the basal tubes grew in.

As it seems to us, the results of this set of experiment may count on special interest, in view of the fact that the end of the regeneration process appears as budding. The analysis of this phenomenon will be dealt with later.

*Cutting off the apical part of the oscular tube (2nd type of operation)*

These experiments have given different results. In certain cases it was observed that all tubes were growing in length and formed, on the apical end, a new oscular part having a smaller diameter as the removed osculum had, but possessing the characteristic marginal structure (Fig. 4/I). The spicules

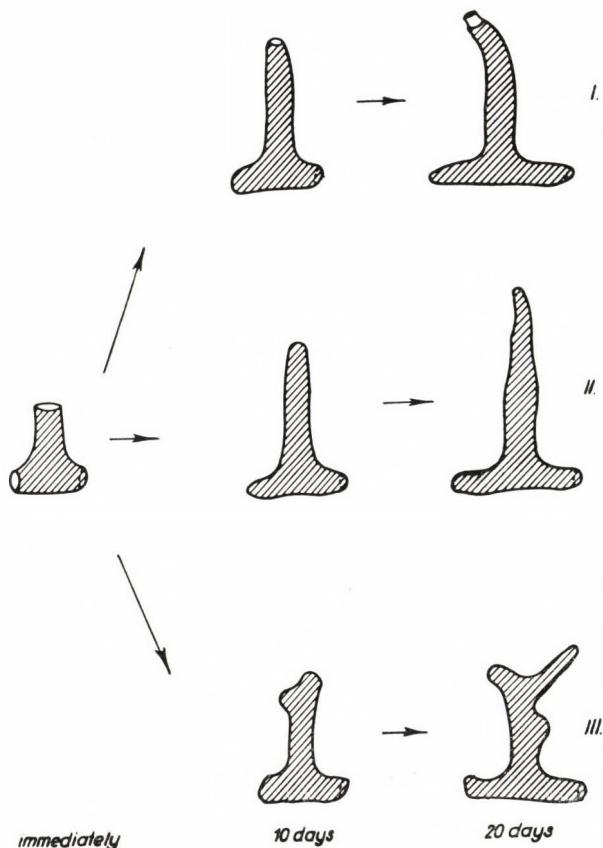


Fig. 4. Three kinds of changes of the oscular tube after cutting off its apical end. Explanation in the text

of the regenerated osculum were arranged much more sparsely as in normal cases. The regeneration process of a new oscular tube requires 10 to 15 days. Such a typical regeneration can be observed only in 10 to 15% of cases.

In 50 to 60% of cases the opening of the oscular tube will be closed up and the further growing of the apical end of the tube takes place without forming an osculum; consequently no typical regeneration process can be observed Fig. 4/II.

In further 30 to 40% of the cases, at the same time as the growth of the apical end of the sponge, the formation of lateral tubes takes place in the regions of the tube closed by the sectioning (Fig. 4/III).

Thus the oscular tube has, after having removed its apical end, the trend to transform, partly or wholly, into stolon-like formations. It remains, naturally, to perform complementary experimental series in order to elucidate also the more divergent results.

#### *Cutting off the basal part of the oscular tube (3rd type of operation)*

Vital observations of oscular tubes, after having removed their basal part, were also performed in the course of 20 to 22 days. No formation of stolon-like structures has been observed on the place of the sectioning in any of the cases. In most cases, the opening of the tube was closed by a transparent

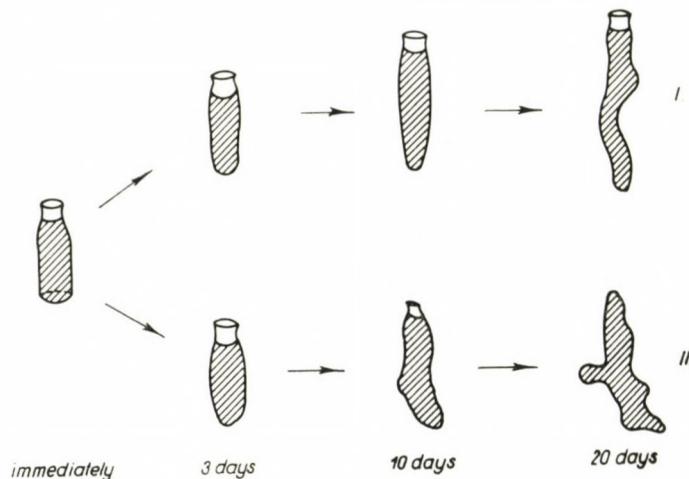


Fig. 5. Two kinds of changes of the oscular tube after cutting off the basal end.  
Explanation in the text

cell-membrane at first, and by a layer of choanocytes later, while a skeleton too was formed at the same time; it then happened here the same, as in the case of the "wound-healing".

Later on, the whole tube has gradually lengthened, but it became also thinner. On a single place of several ones of the tube lateral outgrowths formed as rudiments of buds of the new tubes (Fig. 5/I). The osculum remained open and functioned normally.

In a not too high percentage of cases (about 15%), the opening of the osculum was strongly narrowed, and in two sponges it remained wholly closed during 18 to 20 days. As in the preceding cases, lateral tubes were also formed (Fig. 5/II).

In this manner, similarly as in the second experimental set, the oscular tubes — after the removal of their basal part — take over, partly or wholly, the function of the stolon.

Also these experiments are to be continued in order to elucidate, on the one side, what becomes of the oscular tubes in the course of longer periods after the moment of the operation, as well as to solve, on the other side, the problem whether sponges have a polarity in well-developed form. The latter problem is of fundamental importance, as to the clear establishment of organization characteristics of these animals.

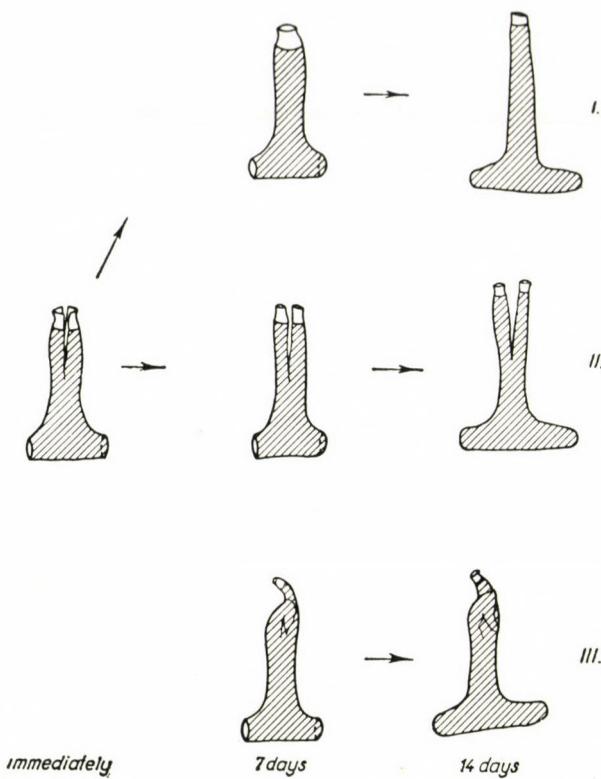
#### *Longitudinal incision of the apical end of the oscular tube (4th type of operation)*

We have observed, in the course of a minor experimental set (20 operations), the behaviour of sponges cut in length from the apical end of the oscular tube, as far as its half length. Vital observations were performed in the course of 14 days.

In 55% of cases (11 sponges) the borders of the wound grew together and an oscular tube of the former structure was reestablished (Fig. 6/I). In 30% of cases (6 sponges), in 3 to 4 days from the beginning of the experiment, the apical end of the oscular tube was doubled (Fig. 6/II). Contrary to the fresh-water sponges, the two oscular regions, after having been formed, did not coalesce with one another. Both oscula remained, in the course of the whole experiment, distinctly isolated (Fig. 7 represents photo of a sponge with double apical regions). Finally, in 15% of cases (3 sponges) there was a partial concrescence only, resulting in the formation of various teratologic growth (Fig. 6/III).

#### *Cutting of the wall of the oscular tube into pieces of about 1 to 3 mm size in diameter (5th type of operation)*

We have stated, as a result of vital observations (for 15 to 20 days), on small pieces cut out in the wall of the oscular tube, that each of these pieces has the capacity to form a small tube subsequently growing, and what is more, ramifying (Fig. 8/A). The development of sponges from isolated pieces proceeds



*Fig. 6.* Three kinds of changes of the oscular tube after incision of the apical end.  
Explanation in the text



*Fig. 7.* Sponge with double apical end.  $16 \times$

in different ways depending on the size of the pieces. The development of a fragment having a size of 1,5 mm in diameter begins with its borders curbing in, on the side of the gastral cavity (spongocoel), and between which a two-layered transparent cell-membrane will gradually form. Also the lateral opening will be covered by the same membrane in the course of 3 to 4 days, after the experiment was started. Further on, the place of the concrescence will become indistinguishable from the other parts of the sponge. A small sponge will thus develop, possessing a rounded or in one direction slightly

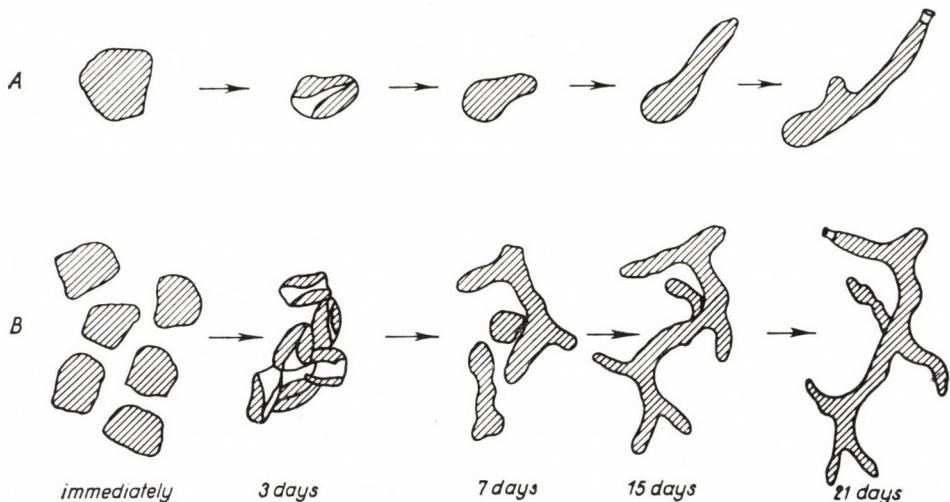


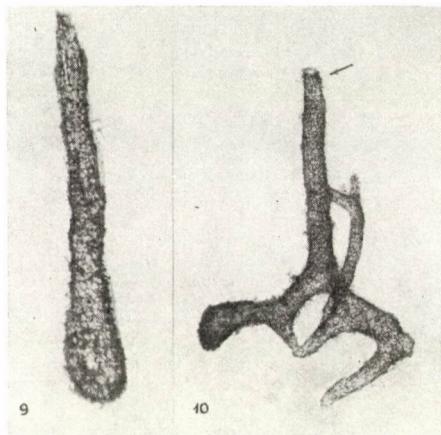
Fig. 8. Development of sponge from pieces cut out from the wall of the oscular tube. A — Development of the sponge from isolated piece. B — Development of the sponge as a result of common cultivation of several pieces

elongated shape, but having no osculum yet. It will elongate later in the direction of the axis, or a bud will be formed somewhere, growing up gradually afterwards. Subsequently, small lateral buds also may appear. On the end of the oscular tube growing most intensively, an osculum will be formed on the 15 to 18th day. This process is represented schematically in Fig. 8 in the first row. Fig. 9 shows the photo of a sponge developed from a single piece.

Pieces of a smaller size (about 1 mm or less) will be reduced at first by means of the transformation of the choanocytes into amoeboid cells; the spicules of the skeleton will be pushed out; a certain number of cells die, while the remaining cells form a flattened mass of an irregular shape. From this mass of cells a miniature sponge will develop with an elongated shape at first, and a little ramified later; also a skeleton will be newly formed in it, and the other structures will differentiate too. This process, going with far-reaching destructive changes, proceeds significantly slower, than the development of

sponges from pieces of a large size. In certain cases e. g., when the development of the sponges was observed for a month, they had the shape of slightly ramifying thin tubes with irregular thickenings, and showed the first signs of skeleton-building, but had no oscula yet. The development of sponges from pieces of larger size will be finished in 15 to 18 days.

In cases, when the pieces are cultivated in close contact with one another, they will be coalesced at various stadia of development; thus the size of the forming sponge colonies will continually become larger, parallel with the



*Fig. 9. Sponge developed from an isolated piece of about 2 mm size. 30 ×*

*Fig. 10. Sponge colony developing from several pieces cultivated in the common way.  
Arrow points to osculum*

progressing development, while the number of the isolated small sponges decreases proportionally. The coalescence may proceed on various places, on wound-surfaces, as well as on unwounded ones. After coalescence the oscular tubes developed from isolated pieces by way of anastomoses, produce a unified system with communicating inner cavities. A scheme of this process is represented in Fig. 8/B. In the newly formed colonies we generally observed one osculum or two in formation. In certain cases, however, all tubes of the colony remained closed on their end, until the conclusion of the experiment. Fig. 10 shows a sponge colony formed by means of coalescence of several pieces (having a size of about 1,5 mm in diameter). The photo of this colony was made on the 20th day after operation and shows one oscular opening.

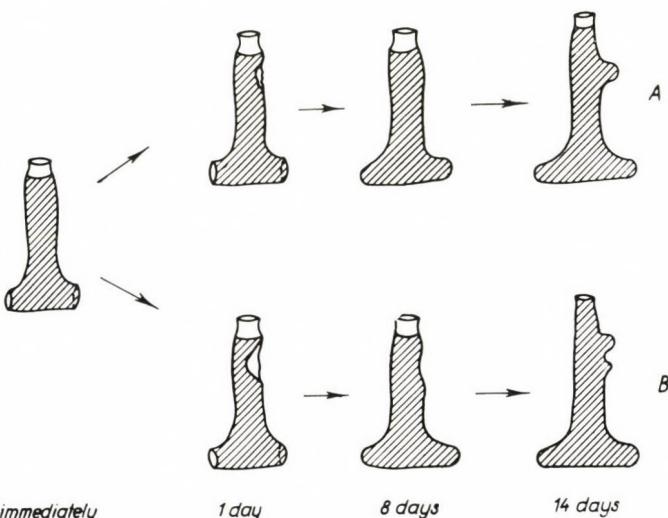
#### *Use of punctured burns (6th type of operations)*

The experiments by means of burns were carried out on oscular tubes without lateral ramifications. The burn was performed with a thin preparing

needle heated in the flame of an alcohol-lamp. We have taken pains in order to make burns of about equal intensity, as well as on the same place (in the upper third of the oscular tube). Strong burns cause the formation of wide necrotic zones, as a result of which the apical part of the oscular tube may break off.

We have observed the operated oscular tubes for 15 to 20 days.

In the first two days after the burn was made, in the region of the wound, necrosing cells and spicules of the skeleton can be observed to be pushed off. On the 3rd and 4th days, a gradual closing of the wound with a two-layered cell-membrane can be seen. In 5 to 7 days the layer of choanocytes, as well as



*Fig. 11. Formation of lateral buds on sponges after punctured burns of different intensity.  
X — the place of the burn. Explanation in the text*

pores and spicules will be formed. The complete wound-healing requires 9 to 10 days on the average (at a temperature of 4—6° C). Raising the temperature by 2 to 3 degrees, will accelerate regeneration by 2 to 3 days.

As in cases of the elimination of defects in the wall of the oscular tubes after cutting out small pieces, the wound-healing proceeds after burns the more rapidly, the smaller the zone of the necrosing cells, *i. e.* the smaller the size of the opening formed after detachment of the necrotic zone was.

Regeneration of structures after burns is similar to those processes observed in our first experimental set (*i. e.* cutting out pieces from the wall of the oscular tube). However, as it was to be expected, the necrosis of a great number of cells, caused by the burn, retards the process of regeneration.

Also the divergent results obtained in these experiments by means of burns, are of special interest. It has been shown that the morphogenetic pro-

cesses will not be finished with the wound-healing and the new-formation of the normal structures in the body wall of the sponges. On the 10 to 12th day already (chiefly in experiments performed at higher temperatures) in many operated sponges a bud, or more rarely two buds were formed on the place of the burn. Further on, these buds had grown up and formed the rudiments of the lateral tubes, just as in the first experimental set (Fig. 11).

We have observed, in a group of the operated sponges, the development of lateral buds in nearly 100% of cases, however, in other groups they were

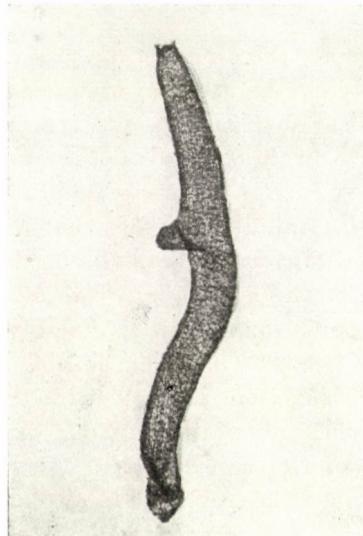


Fig. 12. Sponge with a bud formed on the place of a burn. 16 ×

formed in 40—60% of the operated sponges. Moreover, a certain regularity manifests itself here, namely, in cases when the burn was stronger, the bud-formation on the wound-places was more frequent, sometimes two buds being formed at the same time (Fig. 11). In this manner, there is a certain connection between the grade of destruction of tissues in the zone of the burn, and the frequency of forming buds of the lateral tubes.

In Fig. 12 a sponge is represented with a lateral bud forming on the place of a burn (the photo was made on the 15th day after operation).

#### Discussion

As already mentioned in the introduction, the colony of sponges, as well as the isolated individual (zooid), are of a very low grade of integration. Notably, the calcareous sponge *Leucosolenia complicata* forms a very primitive

colony with individuals connected with one another only by the common stolon spreading over the substratum. The vertical oscular tubes of *Leucosolenia* can beyond doubt be regarded as single individuals. BEKLEMISHEV writes in this connection as follows: "In the case of *Leucosolenia* (Calcarea) the individuals being often almost isolated, are connected by a common network of stolons spreading over the substratum and originating by way of growing of the aboral pole of the first individual of the colony. In this way a primitive sponge colony will be formed with a low degree of integration, which contains well-separated zooids differing only slightly from isolated calcareous sponges" [3 p. 68].

In our own experiments the oscular tube was isolated with a small part of the stolon, consequently, we had to deal with a single individual of sponge.

The results of our vital observations on regenerative processes of various kinds in *Leucosolenia* show, in the first place, that bud-forming processes and other forms of asexual reproduction can easily be provoked under experimental conditions. It is enough to remind of the fact that the experiments by means of burns, cutting out pieces from the wall of the oscular tube, cutting into small fragments, incision of the apical end, were all resulting, in a high percentage of cases, in the formation of new sponges, or in early developmental stadia of new individuals (buds). The formation of doubled oscular tubes, in the experiments by means of incisions, as well as the transformation of operated sponges into closed ramifying tubes (after cutting off the apical or basal parts) are, beyond doubt, facts of the same type.

Finally the formation of lateral tubes may be also regarded as the experimentally-provoked formation of new stolons since we did not observe the formation of new oscula on the end of such lateral "sprouts". The final solution of this question needs further experimental series in order to observe the developing sponges for a longer period.

However, the fact, e. g. that after cutting out or burning the body wall of the sponge, we obtained a "hyper-regeneration" and the formation of buds of new tubes on the wound place, allow of presuming that the end of regeneration processes of this type is not a simple "wound-healing", in most cases, but a process closely related to the asexual reproduction. Moreover, the cases in which the newly-formed lateral bud does not transform into oscular tube immediately after operation, do not exclude the interpretation of the facts mentioned above as initial stadia of the colony-formation by way of budding. The new individuals of the colony might later appear on other places, after the attachment of the sponge and the formation of a new stolon. The fact that the sponges can easily form new buds on injured places makes it probable, that the budding, (the main form of asexual reproduction of *Leucosolenia complicata* in the summer period) in natural conditions too is a reaction of sponges to local injuries of various types.

In connection with this problem the view of TOKIN [32] as to the causes of bud-formation and other forms of asexual reproduction wants to be explained. According to him, the local desintegration of tissue systems can result in starting to develop a new organism. This accounts for the fact that the process of asexual reproduction can be found chiefly in animals of lower grade of integration, in which the cells can more easily extricate themselves "from the powers of correlation". Consequently, we can provoke, by way of experiments too, the development of whole organisms from somatic cells more often in animals having a low integration. According to the views of TOKIN, the more was the tissue desintegrated, the greater is the probability of the development proceeding in conformity to the type of somatic embryogenesis.

The results of our experiments support these considerations. In fact, in comparing the observations as to the reactions of sponges in the experiments by way of cuttings and burns, there is a certain regularity to be observed, namely, the stronger the trauma was (*i. e.* in experiments by means of burns), the higher was the percentage of the bud-formation; it was the highest in cases of specimens having larger wounds at the beginning of the experiments. Finally, in the case of total destruction of the organization of the oscular tube (cutting into small pieces), each of the isolated pieces has the capacity to develop into a new individual and then, into a new sponge colony. Observations on isolated pieces show this clearly. In cases, when the isolated pieces have grown together, at the same time colonies of the form of branching tubes developed having one osculum or two.

The investigated sponges have also the capacity to regenerate according to the type of the true regeneration. The new-formation of the normal structure of the oscular tube by way of "wound-healing" took place after having incision of the apical end of the oscular tube, after excisions and burns, as well as on wound-surfaces of oscular tubes cut out from the stolon. Besides, we observed, in a small percentage of the cases, the new-formation of oscula of normal structure after having cut off the apical end of the oscular tube. The diameter of the regenerated oscular part was, however, smaller than that of a normal oscular tube, and its skeletal system was less developed.

Thus, *Leucosolenia complicata* shows the phenomena of the true regeneration, as well as those of the somatic embryogenesis. However, the morphogenetic processes of the somatic embryogenesis were dominating in the different kinds of experiments. Further on, it seems to be worth to compare the mechanisms of morphogenetic processes in the different regenerative phenomena.

## LITERATURE

1. ALLEMAND, A. (1907) Étude de physiologie appliquée à la spongiculture sur les côtes de Tunisie. Thèses, Lyon—Tunis.
2. ARNDT, W. (1938) Porifera. In: Tierwelt der Nord- und Ostsee. **27** III. a. 1.
3. Беклемишев В. Н. (1952) Основы сравнительной анатомии беспозвоночных. Советская наука, Москва.
4. BRIEN, P. (1937) La réorganisation de l'éponge après dissociation par filtration et phénomènes d'involution chez *Ephydatia fluviatilis*. *Arch. Biol. (Paris)*, **48**, 185—268.
5. BRØNDSTED, H. V. (1953) The ability to differentiate and the fate of regenerated cells, after repeated regeneration in *Spongilla lacustris*. *Quart. J. Micr. Sci.*, **94**, 177—184.
6. BURTON, M. (1933) Sponges without collar cells. *Nature*, **131**, 209—210.
7. BURTON, M. (1949) Non-sexual reproduction in sponges, with special reference to a collection of young *Geodia*. *Proc. Linn. Soc. London*, **160**, 163—178.
8. FAURÉ-FREMIET, E. (1925) Le mécanisme de la formation des complexes à partir de cellules d'Éponges dissociées. *C. R. Soc. Biol.*, **93**, 618.
9. FAURÉ-FREMIET, E. (1932) Morphogenèse expérimentale (reconstitution) chez *Ficulina fucus*. *Arch. Anat. Microsc.*, **28**, 1—80.
10. FAURÉ-FREMIET, E. (1932) Involution expérimentale et tension de structure dans le cultures de *Ficulina fucus*. *Arch. Anat. Micr.*, **28**, 121—157.
11. GALTSOFF, P. S. (1925) Regeneration after dissociation (an experimental study on sponges). I. Behaviour of dissociated cells of *Microciona prolifera* under normal and altered conditions. *J. exp. Zool.*, **42** 183—222.
12. GALTSOFF, P. S. (1925) Regeneration after dissociation (an experimental study on sponges). II. Histogenesis of *Microciona prolifera*. *J. exp. Zool.*, **42**, 223—256.
13. GALTSOFF, P. S. (1929) Heteroagglutination of dissociated sponge cells. *Biol. Bull.*, **57**, 256—260.
14. Ганин, М. С. (1879) Материалы к познанию строения и развития губок, Варшава
15. HAECKEL, E. (1872) Die Kalkschwämme, **2**, 93—96.
16. HUXLEY, J. S. (1911) Some phenomena of regeneration in *Sycon*, with a note on the structure of its collar-cells. *Phil. Trans. Roy. Soc., B* **202**, 165.
17. HUXLEY, J. S. (1921) Further studies on restitution-bodies and free tissue-culture in *Sycon*. *Quart. J. Micr. Sci.*, **65**, 293—322.
18. JONES, W. C. (1957) The contactility and healing behaviour of pieces of *Leucosolenia complicata*. *Quart. J. Micr. Sci.*, **98**, 203—217.
19. Короткова Г. П., Волкова Г. А. (1960) Эксперименты по регенерации пресноводны губок. Вестник Ленингр. универс., сер. биол., (9).
20. LAUBENFELS, M. W. (1932) Morphology and physiology of Porifera exemplified by *Iotrocha birotulata* HIGGIN. *Carnegie Inst. Wash.*, **435**, 37—66.
21. LIEBERKÜHN, N. (1856) Zusätze zur Entwicklungsgeschichte der Spongilliden. *Arch. Anat. Phys. Wiss. Med.*, 456—514.
22. LIEBERKÜHN, N. (1857) Beiträge zur Anatomie der Spongien. *Arch. Anat. Phys. Wiss. Med.*, 376.
23. MAAS, O. (1910) Über Nichtregeneration bei Spongien. *Wilhelm Roux Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, **30**, 356—378.
24. METSCHNIKOFF, E. (1876) Beiträge zur Morphologie der Spongien. *Z. wiss. Zool.*, **27**.
25. METSCHNIKOFF, E. (1879) Spongiologische Studien. *Z. wiss. Zool.*, **32**, 379—387.
26. MINCHIN, E. A. (1898) Materials of a monograph of the Ascons. I. On the origin and growth of the triradiate and quadriradiate spicules in the family Clathrinidae. *Quart. J. Micr. Sci.*, **60**, 469—587.
27. MÜLLER, K. (1911) Das Regenerationsvermögen der Süßwasserschwämme. *Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org.*, **32**, 397—446.
28. PENNEY, J. T. (1933) Reduction and regeneration in fresh-water sponges (*Spongilla discoides*). *J. exp. Zool.*, **65**, 475—492.
29. Резвой П. Д. (1936) Пресноводные губки. Фауна СССР. Губки. Изд. АН СССР, Москва.
30. SIVARAMKRISHNAN, V. R. (1951) Studies on early development and regeneration in some Indian marine sponges. *Proc. Ind. Acad. Sci.*, **34**, 273—310.
31. Стюдитский, А. Н. (1952) Основы биологической теории регенерации. Изв. Акад. Наук СССР, сер. биол., (6).
32. Токин, Б. П. (1959) Регенерация и соматический эмбриогенез. Изд. ЛГУ, Ленинград.
33. URBAN, P. (1910) Zur Kenntnis der Biologie und Cytologie der Kalkschwämme (Familie Clathrinidae Minch.) *Internat. Rev. Hydrobiol.*, **3**, 37—46.

34. VAN TRIGT, H. (1919) A contribution to the physiology of the fresh-water sponges. *Tijdschr Nederland. Dierk. Vereen.*, **17**, 1—220.
35. Воронцова, М. А. (1949) Регенерация органов у животных. Советская наука, Москва.
36. Воронцова, М. А., Лиознер, Л. Д. (1957) Бесполое размножение и регенерация. Советская наука, Москва.
37. WELTNER, W. (1893) Spongillidenstudien. II. *Arch. Naturgesch.*, **59**, 245—282.
38. WELTNER, W. (1907) Spongillidenstudien. V. Zur Biologie von *Ephydatia fluviatilis* und die Bedeutung der Amoebozyten der Spongilliden. *Arch. Naturgesch.*, **73**, 1.
39. WILSON, H. V. (1907) On some phenomena of coalescence and regeneration in Sponges. *J. exp. Zool.*, **5**, 245—258.
40. WILSON, H. V. (1911) Development of sponges from dissociated tissue cells. *U. S. Bur. Fisheries Bull.*, **30**, 1—30.
41. WILSON, H. V., PENNEY, J. T. (1930) The regeneration of sponges (*Microciona*) from dissociated cells. *J. exp. Zool.*, **56**, 73—147.
42. WINTERMANN—KILLIAN, G. (1951) Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an Süßwasserschwämmen. *Zool. Jahrb. (Anat.)*, **71**, 427—486.

#### REGENERATION UND SOMATISCHE EMBRYOGENESE DES KALKSCHWAMMES LEUCOSOLENIA COMPLICATA MENT.

Verfasserin führte vitale Beobachtungen an Regenerationsvorgängen des Kalkschwamms *Leucosolenia complicata*, unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, durch. Die Experimente wurden an Oscularröhren von etwa 1 mm Durchmesser vollgezogen, die aus der Wand einer Schwammkolonie mit einem kleinen Teil des Stolons ausgeschnitten worden sind. Folgende Operationen wurden durchgeführt: 1. Ausschneidung von kleinen Stücken aus der Wand der Oscularröhre (250 Operationen); 2. Wegschneidung des apikalen Endes der Oscularröhre (62 Operationen); 3. Wegschneidung des basalen Teiles der Oscularröhre (50 Operationen); 4. Longitudinale Einschneidung des apikalen Endes der Oscularröhre (20 operationen); 5. Zerschneidung der Wand der Oscularröhre in Stücke von etwa 1 bis 2 mm Durchmesser (zwei Serien von Experimenten); 6. Punktformige Ausbrennungen (130 Operationen). Die Oscularröhre regenerierte ihre normale Struktur nach Ausschneidung von kleinen Stücken, ebensowohl nach punktförmigen Ausbrennungen. Ähnliche Prozeße konnten an den Wundflächen beobachtet werden, welche durch die Wegschneidung der Oscularröhre von dem Stolon entstanden sind. Schwämme, die nach dem ersten und zweiten Experiment behandelt wurden, entwickelten Knospen an den verletzten Stellen nach der Regeneration (zu 25% der Fälle nach Ausschneidungen und zu 40—60% nach Ausbrennungen). Nach der Wegschneidung des apikalen Teiles der Oscularröhre regenerierte sich ein neues Osculum von einer normalen Struktur in 10 bis 15% der Fälle. Im allgemeinen wandelten sich aber die Schwämme nach Entfernung ihrer apikalen und basalen Enden zu stolonförmigen Gebilden um. Zu 30% der Fälle (im Experimente 4.) erhielten wir als Resultat die Duplikation von Enden der Oscularröhren. Aus der Wand der Oscularröhre herausgeschnittene kleine Stücke entwickelten sich zu Miniatur-Schwämmen, die leicht miteinander zusammenwuchsen und mit einem Osculum oder mit mehreren Oscula ausgestattete Kolonien bildeten. Diese Experimente und die Angaben der Literatur haben die Verfasserin zur Feststellung geführt, daß die morphogenetischen Vorgänge der somatischen Embryogenese in den Schwämmen zwar dominieren, aber auch Erscheinungen der echten Regeneration sich manifestieren können.

#### РЕГЕНЕРАЦИЯ И СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ У ИЗВЕСТКОВОЙ ГУБКИ LEUCOSOLENIA COMPLICATA MENT.

Были проведены прижизненные наблюдения за восстановительными процессами у известковой губки *Leucosolenia complicata* при различных экспериментальных вмешательствах. Опыты производились на оскулярных трубках (около 1 мм в диаметре), отделённых от остальной колонии с небольшим участком столона.

##### Типы операций:

1. Вырезание небольших кусочков из стенки оскулярной трубы — 250 операций
2. Отрезание апикального отдела оскулярной трубы — 62 операции. 3. Отрезание базального отдела оскулярной трубы — 50 операций. 4. Надрезание в продольном

направлении апикального конца оскулярной трубки — 20 операций. 5. Разрезание стенки оскулярной трубы на кусочки размером около 1—2 мм в поперечнике (две серии опытов). 6. Нанесение точечных ожогов — 130 операций.

Происходило восстановление нормального строения стенки оскулярной трубы после вырезания кусочков и после точечных ожогов. Аналогичный процесс наблюдался и на раневых поверхностях после отрезания оскулярных трубок от столона.

У оперированных губок в 1-м и 2-м вариантах опытов после регенерации образовывались почки на месте травм (у 25% — после вырезов и в 40—60% случаев после ожогов).

После отрезания апикального отдела оскулярной трубы в 10—15% случаев происходило восстановление оскулюма типичного строения. Однако, губки с удаленными апикальными и базальными концами преобразовывались главным образом в столоноподобные образования.

В 30% случаев (в четвертом варианте опыта) удалось получить раздвоенные на концах оскулярные трубы.

Из небольших кусочков, вырезанных из стенки оскулярной трубы, развивались маленькие губки, которые легко срастались друг с другом и образовывали колонии с одним или с двумя устьями.

На основании собственных исследований и сопоставления литературных данных следует признать, что у губок преобладают морфогенетические процессы, идущие по типу соматического эмбриогенеза, но могут иметь место и явления собственно регенерации.

Г. П. Короткова, Ленинград В. О. Менделеевская ул. 5. СССР.

# PHYLOGENETISCHE WERTUNG KONVERGENTER UND DIVERGENTER EIGENSCHAFTEN BEI DEN SUKTORIEN

J. KORMOS und KATALIN KORMOS

ZYTOGENETISCHES LABORATORIUM, SZEGED (VORSTAND: J. KORMOS)

(Eingegangen: 6. Mai, 1960)

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die phylogenetische Bedeutung und den kategorisierenden Wert der Schwärmerstruktur, der Schwärmerbildung, der entwickelten Organisation, der konvergenten und divergenten Veränderungen der Lebensweise und der Lebensphasen, indem sie die Suktorian-Familien miteinander vergleicht.

Wichtige Grundtypen der Zellteilung, einige Veränderungen der Saugrörchen, das Auftreten der offenrandigen Hülle (lorica), ausnahmsweise Schwärmermodifikation — sind ausschließlich für einzelne Familien charakteristisch. Die larvale und entwickelte Organisation, die meisten Züge der Lebensweise und der Lebensphasen erscheinen dagegen auf konvergente Weise nicht nur in Familien, sondern auch in Genera, ja sogar manchmal in Arten, deshalb können sie in der phylogenetischen Erwägung nur beschränkt angewendet werden. Auch die Wertung sämtlicher Eigenschaften beweist, daß die übrigen fünf Suktorian-Familien von den Podophryiden divergierend ableitbar sind; allein zwischen den Familien Discophryidae und Dendrocometidae ist eine nähere — aber nicht beweisende — Abstammungsverbindung möglich.

Die phylogenetischen Modifikationen, die auf Grund der Zellteilungs- und Schwärmer-typen ausgeführt wurden, werden auch durch die Wertung der übrigen Eigenschaften unterstützt. Bedeutend unter ihnen sind die folgenden: a) Ausschaltung der heterogenen Glieder der Familie Podophryidae. b) Einordnung der Genera *Parapodophrya*, *Thecacineteta*, *Tachyblaston* in die Familie Ophryodendridae. — Die Aufstellung der Familien Tachyblastonidae (GRELL) und Thecacinetidae (MATTTHES) ist unnötig. c) Definitive Vereinigung der Familien Acinetidae und Dendrosomidae. d) Einreihung der Genera *Paracineta* und *Physaliella* in die Familie Discophryidae und Einreihung der Genera *Urnula* (und *Metacineta*) in die Familie Acinetidae.

## Einleitung

Seit dem Erscheinen einer unserer früheren Arbeiten [21] haben wir mehrere Ergebnisse publiziert, die zur Erkennung der inneren verwandtschaftlichen Beziehungen der Suktorian und zur richtigeren Ausbildung der Kategorien unmittelbar oder mittelbar beitragen [23, 24, 25, 26, 27, 28 usw.]. Die fertigen Ergebnisse zahlreicher Detailuntersuchungen sind auch zur Veröffentlichung bereit. Es ist aktuell, die einschlägigen Angaben — als Ergänzung und Fortsetzung der ersten Abhandlung — kurz zusammenzufassen und das unlängst publizierte phylogenetische System der Familien [26], das in erster Linie auf den Zellteilungstypen und auf der Organisation des Schwärmers beruht, auch mit der Erwägung anderer Eigenschaften zu bestätigen.

Die richtige phylogenetische Erwägung nimmt alle Stadien und Phasen des Lebenszyklus, alle Züge des Organismus der Reihe nach vor. Dabei ist der Lebenszyklus der Suktiorien reicher, als wir es angenommen haben. Er wird nicht nur durch den larvalen Zustand, und durch die damit verbundenen mannigfachen ontogenetischen Typen, sondern auch durch den Generationswechsel bereichert. Wir fangen erst jetzt an zu erkennen, wie sich das Ruhestadium entwickelt, das nicht seinesgleichen hat. Dies ist auch das Ergebnis eines separaten Lebenszyklus: es entwickelt sich mittels Knospung ein von dem vegetativen abweichender Schwärmer, der durch eine echte Metamorphose ins Ruhestadium übergeht [28]. Das Geschlechtsleben besteht auch nicht immer aus einer Phase, es entspricht manchmal einem ganzem Zyklus, da das Leben wenigstens des einen Partners nach der Knospung, dem eigenartigen Schwärmerzustand, der Metamorphose und dem noch eigenartigeren Konjugantenzustand tatsächlich in einem geschlossenen Zyklus endet.

Mit den Obengesagten weisen wir darauf hin, daß wenn jetzt die wichtigsten Züge zusammengefaßt werden, bleibt noch vieles übrig, was der Vollständigkeit halber über die Süßwasser- und vor allem über die Seesuktiorien hinzugefügt werden soll. Sobald als möglich werden auch die letzteren der Reihe nach vorgenommen werden.

### Die Organisation des Schwärmers

Früher [26] sind wir zu der Folgerung gekommen, daß der kategorisierende Wert des Schwärmerzustandes kleiner ist als der des Zellteilungstypes, weil die Organisation des Schwärmers sich je nach Familien konvergent ändert. Es wurde darauf hingewiesen, daß die beiden entgegengesetzten Strukturtypen, die bei den einfachsten Podophryiden innerhalb eines sehr kleinen Verwandtschaftskreises auftreten (*Sphaerophrya-Podophrya*), einen Mutationscharakter haben [21, 26]. Es wird besonders betont, daß das konvergente Erscheinen der Strukturtypen nicht soviel bedeutet, daß bei dem einen Typ die *Sphaerophrya* und bei dem anderen die *Podophrya* als phylogenetischer Ausgang diente, sondern daß es die ähnlich gerichtete Veränderung der Struktur besagt. In diesem Sinne kann derjenige Schwärmetyp der Discophryiden, Dendrocometiden und der Ophryodendriden mit der *Podophrya* verglichen werden, der in der Ebene des Ziliengürtels abgeflacht ist und bei dem meistens eine der Nebenachsen zur Längsachse geworden ist. Neben dem *Podophrya*-Charakter bewahren sie einen eigenartigen Zug, der an den „*Sphaerophrya*“-Typ der einzelnen Familien erinnert und auf eine unmittelbare Beziehung mit demselben hinweist. Bei den Acinetiden kennen wir zwischen den extremen Typen auch verbindende Schwärmerstrukturen [21], bei den Ophryodendriden scheint aber der Schwärmer von *Thecacina* und „*Prae-*

*theecineta*" — auf Grund der Augaben [32, 37] — ebenso entgegengesetzt zu sein wie der Schwärmer von *Sphaerophrya* und *Podophrya*. Aus dem terminalen Charakter der Ziliatur des Schwärmers von *Thecacineta* ist die völlig ventrale und nicht marginale Lage der Ziliatur von *Praethecacineta* verständlich. Der subterminale oder terminale Schwärmer von einfacheren Ophryodendriden läßt sich zwar leicht auf die Organisation des Schwärmtyps von *Sphaerophrya* beziehen, phylogenetisch kennzeichnet er dennoch eine besondere Richtung und systematisch eine besondere Familie. Deshalb kann dieser Schwärmtyp in weiterem Sinne neben der *Sphaerophrya* und der *Podophrya* auch als der dritte Grundtyp der Suktoren aufgefaßt werden (Typ *Parapodophrya*), der innerhalb der Familie Ophryodendridae strukturelle Veränderungen aufweist, die mit denselben der in anderen Familien auftretenden Grundtypen konvergent sind. Der Schwärmer der in die Familie Discophryidae eingereihten [26] *Physaliella* und *Paracineta* wird in der Literatur [13, 35] als „monaxoner“, d. h. als ein Schwärmer von *Sphaerophrya*-Typ bezeichnet; der Schwärmer der in engem Sinne genommenen Discophryiden, besonders der Schwärmer von *Cyclophrya* [17] gehört — was die Struktur anbelangt — eher zum *Podophrya* Typ.

Für den Schwärmer der Discophryen und Caracatharinen (= *Catharina*) ist nicht nur die in der Ebene des Ziliengürtels abgeflachte Körperform charakteristisch, sondern auch die parallelen Zilienreihen, die sich zwischen dem Ziliengürtel befinden [19, 24]. Das konvergente Vorkommen dieser Ziliatur von *Discophrya*-Typ in einer anderen Familie ist bisher nicht bekannt.

Zwecks Vergleichung kann die *Physaliella* wegen ihrer reduzierten, parasitischen Organisation nicht erwogen werden, die *Paracineta* ist aber in ihrer entwickelten Organisation den übrigen Discophryiden, hauptsächlich der *Caracatharina* [19, 17, 2] dermaßen ähnlich, daß wenn die sich auf ihren Schwärmer beziehenden Angaben [2] bewiesen werden, dann kann sie den übrigen Discophryiden auf dieselbe Weise gegenübergestellt werden, wie die *Sphaerophrya* mit der *Podophrya* verglichen wird. Nach unseren heutigen Kenntnissen besitzt die kleine Familie der Ephelotiden und der Dendrocometiden nur einen Schwärmtyp, der zwar zum Formenkreis des *Podophrya*-Typs gehört, doch weisen die Einzelheiten der Organisation dieser Familie, besonders die der Ephelotiden eher auf einen monaxonen (*Sphaerophrya*-Typ) Ursprung hin.

Hat die Strukturveränderung oft einen Mutationscharakter, so gilt das selbe noch mehr und immer für das Auftreten der zilienlosen Schwärmer. Es ist wahrscheinlich, daß dieser Typ auch in mehreren Familien vorhanden ist. Er ist für die Mehrzahl der Ophryodendriden charakteristisch und als Geschlechtsschwärmer ist er bei den Discophryiden bekannt [1, 14, 20]. PENARD [35] erwähnt, daß die *Metacineta mystacina* mittels aufeinanderfolgender Zellteilungen auch einen zilienlosen Schwärmer entwickeln kann.

In einer alten Kultur wurde dasselbe auch von uns beobachtet. Der physiologische Grund der Entwicklung des zilienlosen Schwärmer ist nicht bekannt und wir kennen keine Varietät oder sogar Art unter den Podophryiden, wo die Zilienlosigkeit einen genetischen Zug darstellen würde. Trotzdem weist dieses Beispiel auf die Wahrscheinlichkeit hin, daß der zilienlose Schwärmer auch anderswo auftreten kann.

Eine ökologische Bedeutung und in dieser Beziehung einen „adaptiven“ Charakter haben zwei solche Schwärmertypen, die zugleich auch beweisen, daß die Schwärmer nicht einfach „atavistische“ Larven, „phylogenetische Rekapitulationen“ sind, sondern daß diese in der Phylogene se sich auch von dem entwickelten Zustand unabhängig und oft um so bedeutender verändernde Organisationen darstellen. Diese Veränderung ist in extremen Beispielen dermaßen auffallend, daß wenn z. B. der Schwärmer von *Ophryodendron* [2] zu selbständigerem Leben fähig wäre, dann würde er innerhalb der Ciliophoren mindestens durch die Kategorie der Ordnung abgegrenzt sein. Auch so unterscheidet er sich, als Schwärmer, von der Mehrheit der Suktiorien-Schwärmer in dem dem Ordnungsunterschied entsprechenden Maße, denn kaum könnte man mit einem kleineren Maß die außerordentliche phylogenetische Veränderungen bewerten, die von dem sich schnell bewegenden, mit Ziliengürtel versehenen Schwärmer soweit führte, daß an den beiden Enden des Körpers, parallel mit dem Verlieren der Zilien, sich eine Haftscopula entwickelt, mit deren Hilfe das kleine Protozoon mit kontraktilem Körper nicht nur nach Art des Egels anzuhaften imstande ist, sondern sich auch spannend bewegt! [2, 33, 34]. Der Schwärmer selbst ist daher imstande, innerhalb der Suktiorien sich in ebenso großem Maße zu verändern, wie der Zellteilungstyp, wobei der Charakter der Veränderung eine noch bedeutendere Abweichung vom ursprünglichen Ciliophora-Typ ergibt. Wenn wir innerhalb der Suktiorien eine größere Kategorie als die der Familie trotzdem nicht anwenden, wird dies teilweise durch die konvergenten Veränderungen der Schwärmer, teilweise durch die die extremen Unterschiede verbundenen Zwischenformen begründet.

Trotzdem wir die Ophryodendriden selbst als Meeresprotozoen nicht untersuchen konnten, ist es dennoch gelungen, auf den phylogenetischen Weg des Spanner-Schwärmertyps hinzuweisen [17, 26, 31]. Dieser Weg wird durch in den konvergenten Veränderungen der Schwärmer festgestellte Schritte (Entwicklung der Kontraktilität, Verlieren der Ziliatur, Entwicklung einer doppelten Scopula usw.) bezeichnet, und zwar in solchen Genera, die — auf Grund der Organisation und der Entwicklung des Schwärmer und des entwickelten Tieres — als ursprünglichere, weniger modifizierte Glieder der phylogenetischen Veränderung, aus anderen systematischen Gruppen unter den Ophryodendriden eingegliedert werden sollten. Diese Genera sind: *Parapodophrya*, *Thecacineta*, *Tachyblaston*. *Tachyblaston* besitzt einen bewimperten und auch einen zilienlosen Schwärmer, der vorige weist mit der terminalen

Lage des Ziliengürtels noch auf *Parapodophrya* und *Thecacineta* hin, während der letztere auf den zilienlosen Spanner-Schwärmer der modifizierteren Ophryodendriden hindeutet. Das Bild wird noch vollständiger, wenn wir die Struktur der einzelnen Arten und die Verbreitung des Schwärmer-Dimorphismus in allen Genera der Familie Ophryodendridae genauer kennenlernen. Diese Familie ist — besonders nach der Einreihung der drei Genera — eine der reichsten, was die Mannigfaltigkeit der Formen anbelangt, die Genera können aber darin in einer derart natürlichen Beziehung und Stufenfolge eingeordnet werden, daß die Aufstellung besonderer Familien durch keinen Wesensunterschied begründet wird.

Der Spanner-Schwärmytyp ist eine eigenartige phylogenetische Produktion der Suktiorien, der gerade durch die Abwerfung der Ciliatenmerkmale eine neue Fähigkeit erwirbt. In drei anderen Familien (Acinetidae, Discophryidae, Ephelotidae) erscheint hingegen die hintere fadenziehende Haftscopula außer der vorderen stielbildenden Scopula mit Beibehaltung der Ziliatur und dadurch entsteht ein solcher Schwärmytyp, der in einer sehr ähnlichen Form auch bei den Ciliaten auftritt (z. B. *Trichopus lachmanni*) [4, 5, 17, 26]. Hier ist die Konvergenz gerade deshalb interessant, weil secundär schon auf der Suktiorien-Stufe sich ein eigenartiges Ciliaten-Zellorgan entwickelt hatte (Acinetidae, Discophryidae, Ephelotidae). Die Übereinstimmung wird dadurch charakterisiert, daß die Haftscopula sowohl bei den Ciliaten als auch bei den Suktiorien auf dieselbe Weise abgeleitet wird: aus der Thigmotaxis der entsprechenden ventralen Ziliatur, aus der Lokalisierung der Sekretions- und fadenziehenden Fähigkeit.

Die Discophryiden, die heute als die einfachsten bekannt sind, nämlich die Genera *Caracatharina* und *Cyclophrya*, besitzen auch ohne Haftscopula eine außerordentlich starke Thigmotaxis, Haftfähigkeit. Für die Variierung dieser Fähigkeit ist es charakteristisch, daß während in einem Teil des Genus *Discophrya* (z. B. *D. astaci*) die Sekretions- und fadenziehende Fähigkeit sich in einem lokalisierten Zellorgan konzentriert, erscheint sie in anderen Discophryen kaum, oder überhaupt nicht. Am meisten fehlt sie in den Arten, die keine spezifischen Symphorionen sind, ja sogar auf die feste Unterlage verzichten können und oft an die Oberflächenhaut des Wassers ansiedeln (*D. collini*, *D. endogama*). Auf eine ähnliche und auch ökologisch übereinstimmende Weise verhalten sich die Podophryen und mehrere Acinetiden. Die Schwärmer von *Podophrya fixa*, *P. libera*, *Tokophrya infusionum* usw., die in einer ähnlichen Umgebung leben, sind auch wenig thigmotaktisch, zur Ausscheidung eines Haftfadens sind sie nicht fähig und siedeln häufig an die Oberflächenhaut des Wassers an.

Die stielbildende Scopula stellt ein wirkliches larvales Organell dar, das meistens eine doppelte Rolle spielt. Die eine besteht in der Fixierung zur Unterlage, mittels Ausscheidung einer Haftplatte, die andere hingegen in der Auf-

hebung des Körpers durch Stielentwicklung. Auf der sessilen phylogenetischen Stufe sind schon beide Fähigkeiten primär, die sekundär mehrerlei Modifikationen erleiden können. Diese Modifikationen sind:

a) Das Verlieren der Scopula. In Verbindung damit ist die Fähigkeit sowohl der Fixierung als auch die der Stielbildung verloren gegangen. Im Falle einer parasitischen Lebensweise ist diese Veränderung, die in mehreren Familien ebenfalls konvergent erscheint, ziemlich häufig.

b) Die Scopula bleibt erhalten, die Fähigkeit der Stielbildung wird aber reduziert, oder ist überhaupt nicht vorhanden. Die Reduzierung der Stielbildung wird am schönsten durch die Reihe der Genera *Tokophrya*, *Trichophrya*, *Lernaeophrya* in der Familie Acinetidae demonstriert. Außerdem kann aber dieselbe Erscheinung in den übrigen Familien, beinahe in allen Genera beobachtet werden, bei manchen Arten ist sogar eine bestielte und eine stiellose Varietät bekannt. Überall, wo mehrere Lebenszyklen und in Verbindung damit ein Schwärmer-Dimorphismus vorhanden sind, beschränken sich die Modifikationen der Scopula auf den Schwärmerzustand des einen, oder des anderen Zyklus und sind oft von entgegengesetzter Richtung.

### Die Typen der Schwärmerbildung

In einer unserer Abhandlungen wurde eine Tabelle der Zellteilungstypen der Suktiorien [26] angeführt, indem die frühere [17] richtiggestellt wurde. In zahlreichen Arbeiten befaßten wir uns mit diesen Typen [15, 17, 21, 23, 26, 31] und neulich führten wir auch ein Schema an, das die verwandtschaftlichen Verbindungen der Familien und zugleich den wichtigen kategorisierenden Wert der Schwärmerbildung in erster Linie auf Grund der Zellteilungstypen demonstriert [26].

In der Tabelle [26] wurden die sukzedanen und simultanen Varianten der mehrfachen Knospungstypen nicht angeführt, da diese keine Grundtypen sind. Ihr kategorisirender Wert ist dementsprechend geringer.

Die sukzedane, aufeinanderfolgende mehrfache Knospung wird dadurch charakterisiert, daß die Bildung des zweiten Schwärmers vor dem Abschluß der Bildung des ersten beginnt. Dieser Typ kann bei äußerer und circumvaginativer innerer Knospung gleicherweise vorkommen, sein kategorisierender Wert ist aber unbedeutend. Sein Auftreten kommt auch auf die Ernährtheit und auf die physiologische Beschaffenheit des Muttertieres an. Bei den Acinetiden kommt er ziemlich häufig vor.

Der simultane Typ der mehrfachen Knospung besitzt schon einen bedeutenderen kategorisierenden Wert. An und für sich zwar nicht, aber nebst anderen Zügen kann er zur Charakterisierung der Genera geeignet sein. Es ist eigenartig, daß von den drei Hauptknospungstypen die mehrfache Variante des invaginativen Typs nicht bekannt ist, die beiden anderen Knospungstypen

dagegen konvergent auftreten. So erscheint der simultane Typ der mehrfachen äußeren Knospung im zu den Podophryiden gerechneten Genus *Ophryocephalus* auf eine mit den Ephelotiden völlig übereinstimmende Weise. Die circumvaginative mehrfache Knospung ist in den Genera *Heliophrya*, *Lernaeophrya* und *Dendrosoma* bekannt. Beim Genus *Heliophrya* figuriert sie höchstens als Artunterschied, da *H. riederi* sich mit einfacher und *H. rotunda* mit mehrfacher Knospung vermehrt. Die mehrfache Knospung von *Lernaeophrya* wird gewöhnlich unter den vom Genus *Trichophrya* abgrenzenden Merkmalen erwähnt, an und für sich würde sie aber zur Abgrenzung des Genus auch hier nicht genügen, weil die gleichzeitige Bildung mehrerer Schwärmer auch durch eine entsprechende Körpergröße bedingt wird.

Bei der Erwägung der Zellteilungstypen konnte die entscheidende Wichtigkeit des kategorisierenden Wertes der Haupttypen mehrere Male festgestellt werden. Die Familien Acinetidae-Dendrosomidae konnten in erster Linie auf Grund der Übereinstimmung des Knospungstyps zusammengefaßt werden. Der invaginative Typ stellt einen ausschließlichen Zug der Familien Dendrocometidae und Discophryidae dar. Die Genera *Paracineta* und *Physaliella* werden gerade wegen der invaginativen Knospung in die Familie Discophryidae eingereiht.

Der kategorisierende Wert des Knospungstyps ist in der Familie Podophryidae, besonders in der Familie Ophryodendridae, bedeutend problematischer.

Die Heterogenität der Familie Podophryidae [21] wird durch die Ausschaltung der Genera *Paradophrya*, *Paracineta* und *Tachyblaston* in großem Maße herabgesetzt, es wurde aber darauf hingewiesen [26], daß auch die Eingliederung der Genera *Urnula* und *Metacineta* von provisorischem Charakter ist. Obwohl die erste Phase der Knospung, das äußere Auftreten der Basalkörnchen einen Podophryiden-Zug darstellt, ist die zweite Phase, die semi-circumvaginative Ausscheidung des Körpers des Schwärmers ein Acinetiden-Zug. Dies spricht an und für sich eher für die Familie Podophryidae. Wenn wir aber alle Merkmale in Erwägung ziehen, dann sprechen auf Grund der Struktur der Schwärmer und des entwickelten Tieres mehrere Argumente für die Einordnung in die Familie Acinetidae. In Wirklichkeit gehören diese beiden Genera zu keiner der erwähnten Familien, da sie aber zur Bildung einer selbständigen Familie absondernde Züge in genügendem Maße nicht besitzen, muß man wählen, in welche Familie sie als eine separate Genus-Gruppe, eingruppiert werden sollen. Die Eingliederung in die Familie Acinetidae scheint eine bessere Lösung zu sein. Auch dort weicht diese Gruppe von dem einheitlichen Bild der Familie ab, aber einigermaßen weniger als bei den Podophryen. Die Tatsache, daß der Zellteilungstyp sogar in seinem vorübergehenden Charakter zur Charakterisierung einer separaten systematischen Einheit geeignet ist, weist jedenfalls auf seinen großen kategorisierenden Wert hin.

Nach der Ausschaltung der die Heterogenität hervorruenden Genera bleiben in der Familie Podophryidae die Genera *Podophrya* und *Sphaerophrya* erhalten. Nach unseren heutigen Kenntnissen ordnet KAHL [13] auch das Genus *Ophryocephalus* mit Recht in diese Familie ein, zur endgültigen Entscheidung ist jedoch die gründlichere Kenntnis des Schwärmers und der Entwicklung erforderlich.

Die Zellteilung der Familie Podophryidae ist also eine heteromorphe Zellteilung oder eine Abwandlung derselben, die sich in der Richtung der Knospung modifiziert. In diese Familie sollen aber auch jene Typen eingereiht werden, die sich durch eine wirkliche äußere Knospung vermehren, wenn sie nur Saugrörchen und keine Greiftentakel besitzen. Nicht der Zellteilungstyp, sondern der Besitz der Greiftentakel ist das Merkmal, das die Ephelotiden von den Podophryiden absondert.

Während wir früher [21] — nach GUILCHER — den Zellteilungstyp der Ophryodendriden als äußere Knospung aufgefaßt haben, wissen wir heute, daß der Grundtyp der Zellteilung der Familie Ophryodendridae die kombinierte Zellteilung ist. Einen wichtigen Schritt in der richtigen Beurteilung bedeuteten die Untersuchungen eines der Verfasser der vorliegenden Arbeit über das Genus *Parapodophrya* [28, 31]. Die Genera *Parapodophrya*, *Thecacineta* und *Tachyblaston* können leicht homologisiert werden, die Übereinstimmung ist sogar durch die Vermehrung von *Spelaeophrya* nachweisbar [26, 28, 31]. Es ist gerade die Wesensübereinstimmung der Schwärmerstruktur und des Vermehrungstyps jener Faktor, der die Genera *Parapodophrya*, *Tachyblaston* und *Thecacineta* in die Familie Ophryodendridae einordnet. In Verbindung mit dem Schwärmer wurde bereits erwähnt, daß die Veränderung seiner Struktur die Aufeinanderfolge der Genera bezeichnet. Ebenso stufenweise modifiziert sich auch der Charakter der kombinierten Zellteilung und er verändert sich in der Richtung der äußeren Knospung nur in den am meisten spezialisierten Arten. Einige Schritte der Modifikation sind die folgenden:

1. *Parapodophrya*. Der subterminale Ziliengürtel des Schwärmers bildet sich in einem gut entwickelten invaginativen Schlauch. Die Zweiteilung des Körpers des Tieres geht in Längsrichtung (mit der Richtung der Hauptachse übereinstimmend) vor sich. Der Unterschied zwischen derselben und der quergerichteten (auf die Hauptachse senkrechten) Zellteilung der Podophryen ist scheinbar ein Wesensunterschied. Faktisch stimmen aber die beiden Zellteilungsrichtungen in dem Wichtigsten überein, und zwar darin, daß die Ebene der Zellteilung sowohl beim Genus *Podophrya* als auch beim *Parapodophrya* auf den schwärmerzeitigen Ziliengürtel senkrecht ist!

2. *Thecacineta*. Der terminale Ziliengürtel des Schwärmers entwickelt sich in einem invaginativen Schlauch. Der Körper teilt sich — ebenso wie im Falle von *Parapodophrya* — in einer mit der Hauptachse identischen Ebene.

3. *Tachyblaston*. Der Ziliengürtel des bewimperten Schwärmers entwickelt sich in einem typischen invaginativen Schlauch, aber die Zellteilung ist schon zur Knospung modifiziert. Es ist wahrscheinlich, daß der invaginative Schlauch auch in der Entwicklung des zilienlosen Schwärmers, mindestens in reduzierter Form, zu finden ist.

4. *Spelaeophrya*. Der Schwärmer ist zilienlos; über einen invaginativen Schlauchrest sind keine literarischen Angaben vorhanden. Die Zweiteilung des Körpers stimmt dagegen mit der Längsteilung der Genera *Parapodophrya* und *Thecacineta* wesentlich noch überein. HADŽI [11] erwähnt zwar im Beispiel von *Spelaeophrya* zweierlei Arten der Vermehrung: Knospung und Schizogemmatio, es handelt sich aber offenbar um das Mißverständnis der fixierten Stadien. Er hielt die verschiedenen Einzelheiten desselben Zellteilungstyps für zwei separate Typen; sein »Anfangs«-Stadium stellt wahrscheinlich das Gegen teil desselben, den Zustand nach der Loslösung des Schwärmers, dar. Die «zwei» Vermehrungstypen entsprechen den verschiedenen Einzelheiten der kombinierten Zellteilung.

5. *Ophryodendron*. Die bisherigen Beschreibungen geben über die ersten Phasen der Zellteilung noch kein genaues Bild. Wegen des Fehlens der Zilien des Schwärmers ist es ungewiß, ob sich bei der Bildung des Schwärmers ein invaginativer Schlauch entwickelt, eins ist aber sicher, daß sich die Längszellteilung zur Knospung modifiziert hat.

In der Determination der Stelle der kombinierten Zellteilung findet man sehr auffallende Gegensätze. Am auffallendsten ist der Gegensatz zwischen den Genera *Parapodophrya* und *Thecacineta*. Im vorigen Falle erscheint nämlich — im Gegensatz zu PENARDS Beschreibung — der invaginative Schlauch des neuen Schwärmers in der Nähe des Stiels, im letzteren Falle hingegen — am apikalen Pol. Auf Grund der ursprünglichen determinierenden Rolle des Ziliengürtels ist es wahrscheinlich, daß die Gegend des schwärmerzeitigen Ziliengürtels beim Genus *Thecacineta* durch Translokationsmetamorphose sich auf den apikalen Pol verschoben hat.

Die bisher Gesagten beweisen die folgenden:

1. Der kombinierte Zellteilungstyp ist — trotz seinem «intermediären» Charakter — von einem ebenso wichtigen, selbständigen kategorisierenden Wert wie die anderen Typen.

2. Die Glieder der Familie Ophryodendridae, die eine einfachere Organisation besitzen, vermehren sich mit kombinierter (semi-invaginativer) Zellteilung, die Vermehrung der übrigen Glieder geht mit dem modifizierten Typ derselben vor sich. Die Modifikation besteht darin, daß die ursprüngliche Zweiteilung einen Knospungscharakter annimmt, oder aber sich in eine wirkliche Knospung verwandelt. Es soll noch überprüft werden, ob die Invagination, die als charakteristischer Zug von den Verfassern nicht erwähnt wird, in der Entwicklung des zilienlosen Schwärmers tatsächlich fehlt.

## Die Organisation des entwickelten Tieres

### Körpergestalt

Seine systematische und phylogenetische Bedeutung ist gering. Bei den Podophryen ist die runde Körpergestalt am meisten verbreitet und auch phylogenetisch wahrscheinlich am einfachsten, sie kommt konvergent in den meisten Familien vor.

Die Konvergenz der Körpergestalt wird dadurch bewiesen, daß früher die einfachsten Glieder von drei verschiedenen Familien gerade wegen der Übereinstimmung der Körpergestalt in dasselbe Genus eingereiht wurden (*Podophrya*, *Discophrya collini*, *Parapodophrya*). Eine ähnliche Konvergenz ist auch hinsichtlich der horizontal abgeflachten Körpergestalt bekannt (*Heliophrya*, *Cyclophrya*, *Dendrocometes*), aber andere, eigenartigere Körpergestalten kommen auch als konvergente Züge verschiedener Genus-Gruppen oder Familien vor. So z. B. wiederholt sich die charakteristische Körpergestalt gewisser Acineta-Arten auch hinsichtlich des Stiels, der Hülle und der beiden apikalen Saugbündel bei manchen Arten der Genera *Discophrya* und *Caracatharina*.

Die extremen Veränderungen der Körpergestalt sind die folgenden: scheibenförmige Abflachung in horizontaler Ebene; scheibenförmige Abflachung in vertikaler Ebene; Verlängerung in vertikaler Richtung. Alle drei stellen aus der runden Körpergestalt stammende Formen dar, die in ihrer extremen und intermediären Erscheinung hauptsächlich durch die Verteilung und durch die Gruppierung der Saugröhren in Bündel in ihrem Umriß weiter modifiziert werden. Die gleichmäßige Verteilung der Saugröhren ist für die kugelförmigen Formen charakteristisch. Die Veränderung der Gestalt beeinflußt gewöhnlich auch die Gruppierung der Saugröhren. Dasselbe gilt auch für das Erscheinen der Hülle. In der Verteilung der Saugröhren treten die folgenden Veränderungen, zum Teil je nach Familien konvergent, auf: lokale (z. B. apikale) Gruppierung → Anordnung in Bündel → Bildung eines besonderen retraktilem bündelhaltenden Ansatzes (*suctellophor*) (z. B. *Acineta tuberosa*) → Bildung eines bündelhaltenden Rüssels (*proboscis*) (*Eu-Ophyrodendron*).

Bei den Dendrocometiden und bei einer Gruppe der Acinetiden befinden sich die Saugröhren auf den breiten, steifen, oft verzweigenden Ansätzen des Körpers. Die Genera *Lernaeophrya* und *Dendrosoma* unterscheiden sich von einander im wesentlichen in nichts anderem als in der Länge der Ansätze des Körpers. Dieses Merkmal hat einen sehr relativen Wert und genügt zur Genus-Abgrenzung nicht. Das Genus *Lernaeophrya* stellt in Wirklichkeit eine *Dendrosoma*-Art mit kurzem Ansatz dar. Z. B. ist PENARDS *D. gammari* [35] eine intermediäre Form zwischen *Lernaeophrya* und *D. radians*. Es besteht

kein zureichender Grund, das Genus *Lernaeophrya* (und *Astrophrya*, das im wesentlichen mit dem vorigen identisch ist) zu erhalten.

### *Stiel- und Hüllengebilde*

In Verbindung mit der Scopula wurde schon von den sich auf die Reduzierung des Stiels beziehenden konvergenten Veränderungen gesprochen. Die Entwicklung des Stiels verändert sich in den Genera der Familien, manchmal sogar auch in den Arten, auf eine Weise, die für die Varietäten charakteristisch ist. Die Abnahme der Aktivität der Scopula kann von dem Genus *Tokophrya* angefangen über das Genus *Trichophrya* bis an die Genera *Lernaeophrya* und *Dendrosoma* [21, 17] innerhalb der einzelnen Genera und auch zwischen den Genera verfolgt werden: die Abnahme der Aktivität besteht in der Reduzierung, später im Verlieren der stielbildenden Fähigkeit, schließlich auch im Verlieren der Funktion der Fixierung an Ort und Stelle (Ausscheidung der Haftplatte). Obwohl beim Genus *Lernaeophrya* der Rest der Scopula noch vorhanden ist, hat er nur eine unbedeutende Funktion und die Rolle der Fixierung an Ort und Stelle wird von den Haftansätzen des Körperrandes übernommen [18].

COLLIN unterscheidet zwei Typen der Hülle. Der eine ist die Hülle mit geschlossenem Rand (logé), die sich unmittelbar in die Körperhülle fortsetzt, der andere ist die Hülle mit offenem Rand (coque), die der Lorica der Peritrichen entspricht. Nach COLLIN tritt die Lorica in vier Genera auf: *Thecacineta*, *Solenophrya*, *Metacineta*, *Urnula*. Nach unseren Untersuchungen stellt die Hülle der letzten drei Genera keine Lorica, sondern eine Hülle mit geschlossenem Rand dar, auf deren oberen Teil der Körper des Tieres hängt. Die Hülle von *Thecacineta* ist dagegen in der Tat eine Lorica. Es fragt sich, wie sich der Charakter der Hülle in der Familie Ophryodendridae verändert, zu der das Genus *Thecacineta* gehört.

Die »Lorica« ist für das Genus *Thecacineta* charakteristisch. Sie ist natürlich für die Formen kennzeichnend, die MATTHES [32] als ein separates Genus bezeichnet. Die Absonderung von »*Praethecacineta*« beruht auf der Mitteilung von SCHULZ bezüglich des Schwärmers und mit dem Gegensatz der Schwärmer scheint die Aufstellung des Genus begründet zu sein. Es wäre jedoch nötig, gerade die Ziliatur des Schwärmers genauer zu beschreiben. (Zur Aufstellung des Genus »*Loricophrya*« ist kein entsprechendes abgrenzendes Merkmal vorhanden. Dieses Genus ist unbegründet.) Charakteristisch ist die Lorica auch für den Ruhezustand (»*Dactylophrya*«) des Genus *Tachyblaston*! Bei der parasitischen, trophischen Gestalt ist keine Lorica vorhanden. Auch im Genus *Spelaeophrya* ist die Lorica vorhanden, die Beschreiber der verschiedenen Arten [11, 33, 34, 37] stellen nämlich eine Hülle mit kurzem, aber gut erkennbar offenem Rand dar. Die am meisten entwickelte Hülle ist auf den Zeichnun-

gen von NIE und LU [33], die am wenigsten entwickelte Hülle vielleicht auf STAMMERS Zeichnungen [38] zu sehen. In den anderen Genera der Ophryodendriden sind Hüllen nicht bekannt. — Die Zyste der Parapodophryen ist zwar völlig geschlossen, mit ihren Querrippen und mit ihrer sich bei der Exzystierung öffnenden oberen Pore stellt sie jedoch eine Struktur dar, die auch schon an die Lorica erinnert und die die phylogenetische Vorläuferin sowohl der offenrandigen als auch der geschlossenrandigen Hülle gewesen sein dürfte.

Das Ergebnis der bisherigen Erwägung kann im Folgenden zusammengefaßt werden:

1. Für drei Familien der Suktiorien ist die Hülle mit geschlossenem Rand in ihrer konvergenten Erscheinung charakteristisch (Acinetidae, Discophryidae, Ephelotidae).

2. Bei den Ophryodendridae ist nur eine Hülle mit offenem Rand vorhanden (Lorica-Typ).

Hier sei es erwähnt, daß obwohl alles, was früher über den kategorisierenden Wert der Hülle mit geschlossenem Rand gesagt wurde [21], auch weiterhin gültig bleibt, und obwohl die Genera *Tokophrya* und *Acineta* auf Grund der Hülle auf eine signifikante Weise nicht abgegrenzt werden können, sollen diese beiden Genera aus praktischen Gründen bis zu einer neueren Regelung in Geltung belassen werden. Zur systematischen Überprüfung der Gruppe *Tokophrya-Acineta* ist es nämlich erforderlich, die Schwärmer und die Schwärmerentwicklung der einzelnen Arten gründlicher als bisher kennenzulernen, ja sogar solche Arten zu überprüfen, die in anderen Genera (*Trichophrya*, *Solenophrya*) figurieren.

#### *Die divergenten und konvergenten Veränderungen der Saugrörchen*

Die überwiegende Mehrheit der Suktiorien ist mit sich linear bewegenden, geschlossenen Saugrörchen versehen, die in einem Haftende enden. Die Saugrörchen, die sich in ihrer Bewegung, oder in ihrer Struktur unterscheiden, stammen alle aus diesem Typ, mit den folgenden auffallenden Veränderungen:

1. Schwankendes, sich schlängenartig bewegendes Saugrörchen mit geschlossenem Haftende (*Urnula*, *Acinotopsis*, *Ryncheta*, *Rynchophrya*, *Ophryocephalus*).

2. Das Saugrörchen fehlt, bzw. ist dermaßen reduziert, daß nur das Haftende erhalten geblieben ist (Dendrocometidae).

3. Das Saugrörchen ist stark entwickelt, aber das Haftende fehlt und deshalb ist das Ende des Rohres trichterartig offen (*Choanophrya*).

4. Die Saugrörchen sind offen, haben kein Haftende, aber zur Ergreifung der Beute haben sich besondere Greiftentakel differenziert. Die phylogenetische Vorgeschichte der Bildung der Greiftentakel ist unbekannt. Nicht nur ihre Funktion, sondern auch ihre innere Struktur [36] unterscheidet sich

von derselben der Saugrörchen. Ein gleichwertiger Dimorphismus ist bei anderen Suktiorien nicht bekannt.

Das Tentakel der Ephelotiden sowie die reduzierten Saugrörchen der Dendrocometiden sind ausschließliche Familienmerkmale. Die trichterartigen Saugrörchen des Genus *Choanophrya* weisen schon eine partielle Konvergenz mit den haftkugellosen Saugrörchen der Ephelotiden auf. Die sich schwankend bewegenden Saugrörchen treten konvergent in 5 Genera und 4 Familien auf. Ihre Bewegung, ihr Funktionieren und ihre Struktur stimmt auch überein; es ist dennoch wahrscheinlich, daß ihr kategorisierender Wert nicht ganz gleich ist. Das Genus *Urnula* stellt ein durch sein Saugrörchen und seine Vermehrung gut charakterisiertes Genus dar, die Zugehörigkeit von *Rhyncheta* ist aber unbestimmt, weil die Knospung und der Schwärmer unbekannt sind. Der Dimorphismus der Saugrörchen von *Acinetopsis* und der Unterschied zwischen den Arten dieses Genus soll noch gründlicher kennengelernt werden. Das Genus *Ophryocephalus* ist innerhalb der Familie Podophryidae gut abgrenzbar. Die langen Saugrörchen von *Rhynchophrya palpans* rufen scheinbar einen der *Acinetopsis* ähnlichen Dimorphismus hervor, weil sie mit den gewöhnlichen Saugrörchen zusammen erscheinen. Unsere gründlichere Untersuchung (unveröffentlicht), die viele Individuen und auch die Entwicklung umfaßt, weist aber darauf hin, daß die Entwicklung und die Zahl der langen Saugrörchen sehr unterschiedlich ist und auch bezüglich der Länge Stufenunterschiede vorhanden sind. Jedes beliebige Saugrörchen kann sich gelegentlich verlängern. Diese langen Saugrörchen entwickeln sich langsam und stufenweise erst spät nach der Metamorphose, nach der Entwicklung der gewöhnlichen Saugrörchen, aus einem oder mehreren derselben. Im Beispiel von »*Rhynchophrya*« reichen die schwankenden Saugrörchen zur Genus-Abgrenzung nicht aus; was die anderen Merkmale betrifft, ist der Unterschied zwischen den Arten des Genus *Discophrya* größer als der Unterschied, den die Saugrörchen von *Rhynchophrya* darstellen, eben deshalb soll diese Art in das Genus *Discophrya* eingeordnet werden (*D. palpans*).

### Lebensweise

Die Lebensweise der Suktiorien weist in zwei Richtungen eine häufige Veränderung und einen charakteristischen Unterschied auf, der aber nur ausnahmsweise bedeutend ist. Die eine Richtung ist die Spezialisierung der Auswahl der Nahrung, in erster Linie durch die Veränderung der Struktur und der Affinität der Saugrörchen, der andere Weg, der von dem ersten nicht immer unabhängig ist, ist die Annahme der parasitischen Lebensweise.

Für die erste Richtung liefern die Urnulen das schönste Beispiel [27, 29]. Die Art *Urnula epistylidis* hat sich noch auf Ciliaten (Peritricha) spezialisiert,

übrigens ergreift sie ihre Beute und saugt sie auf die gewöhnliche Weise aus. Eine auf den Discophryiden (*Caracatharina, Cyclophrya*) lebende *Urnula* sp. ist imstande, die *Cyclophrya* auch durch ihr Ektoplasma auszusaugen, sie ist aber auch fähig, das Saugröhren zum Zurückziehen zu zwingen, indem sie es ergreift und die Beute durch dessen Öffnung aussaugt. *U. turpissima* saugt die *Lernaeophrya* nur durch die zum Zurückziehen gezwungenen Saugröhren [27]. Dies stellt eine Art der Spezialisierung dar, die kaum noch gesteigert werden kann. Diese drei Beispiele bezeichnen zugleich den Weg, durch den diese Fähigkeit sich entwickelt hatte. Die Veränderung des Typs des einfachen, sich geradlinig bewegenden Saugröhrens verursacht immer eine Veränderung auch in der Nahrungsaufnahme. Die gewöhnlichen Saugröhren sind in erster Linie zur Ergreifung von frei schwimmenden Ciliaten geeignet, die biegsamen Röhren hingegen sind hauptsächlich zum Ergreifen und Aussaugen von sessilen Peritrichen, oder Suktoren fähig (*Acinetopsis, Urnulen*). Es ist möglich, daß das Genus *Ophryocephalus*, das auf Epheloten lebt, sich — den Urnulen ähnlich (z. B. *U. turpissima*) — aus seinem Wirt ernährt. Bei den Choanophryen ergibt das Saugröhren neuen Typs gleichfalls eine neue Ernährungsweise, indem es das Einsaugen von Nahrungsresten und Granülen sichert. Dieses haftkugellose Saugröhren ist zum Ergreifen von Ciliaten nicht mehr geeignet und das Genus *Choanophrya* könnte kaum anderswo leben, als wo es tatsächlich aufzufinden ist: um die Mundpartie winziger Krebse angesiedelt, wo es sich aus den zerkaute Nahrungsresten derselben als Kommensalist ernährt.

Die Modifikation der Affinität des Saugröhrens geht ohne Strukturveränderung vor sich. Der Affinitätsunterschied bedeutet im Beispiel der Saugröhren den Unterschied der Haftfähigkeit und in allen Fällen bedeutet er zugleich die Mutationsveränderung der Nahrungswahl. Die Nahrungswahl tritt gewöhnlich als der Unterschied kleiner systematischer Kategorien (Arten, Varietäten) auf, sie kann jedoch auch für Genus-Gruppen kennzeichnend sein. Einige Arten sind imstande, viele Typen der Ciliaten zu ergreifen (z. B. *Oxytricha, Paramecium, Colpidium*), andere nur *Oxytricha* (samt anderen Hypotrichen), oder *Oxytricha* und *Colpidium*, oder aber *Paramecium* und *Colpidium*, oder nur *Paramecium*. Dieser Gegensatz der Nahrungswahl tritt in den Suktoren-Familien konvergent auf. Die Affinität variiert von der Haftfähigkeit allgemeinen Charakters angefangen bis zur speziellen Haftfähigkeit und obwohl der Unterschied in den meisten Fällen nicht absolut ist, genügt er jedoch, um die Lebensbedingung der Arten entscheidend zu beeinflussen. Die Empfindlichkeit der Affinität kann sich auch auf den Artunterschied der als Nahrung dienenden Ciliaten erstrecken. So z. B. wählt die Art *Podophrya hungarica* unter den *Paramecium*-Arten, ja sogar unter den *Paramecium*-Varietäten [27]. In der Ordnung *Gymnostomata* ist eine Nahrungswahl ähnlichen Charakters bekannt [27].

Die Nahrungswahl ist auch für die Parasiten kennzeichnend. Die Begriffe des Parasitismus und des Raubens werden bei den Suktoren nicht immer scharf abgegrenzt [3, 27]. Im Beispiel der Suktoren spricht man von einem wirklichen Parasitismus nur dann, wenn die ursprüngliche Ernährungsweise durch das Verlieren der Saugrörchen sich wesentlich verändert hat. Drei Beispiele dieser Lebensweise sind: *Sphaerophrya deliolum*, *Endosphaera engelmanni*, *Physaliella collini*. Konvergente Züge sind: Fehlen der Saugrörchen des entwickelten Tieres (dies soll bei *Sphaerophrya* noch gründlicher untersucht werden), runder Körper, Nahrungsaufnahme durch Osmose. Alle drei befinden sich in Kontakt mit der Pellikula des Wirtes und die Knospung geht in der Richtung der Pellikula des Wirtes vor sich. Der Schwärmer kann nur auf diese Weise ins Freie hinausdringen.

Die Konvergenz erstreckt sich auch auf die Organisation des Schwärmers: die kleinen, monaxonen Schwärmer, deren Ziliengürtel sich in der Mitte des Körpers befindet, sind sehr ähnlich. Vielleicht sind es nur die winzigen Saugrörchen des Schwärmers von *Sph. deliolum*, die einen Unterschied bedeuten.

Sowohl für das Maß der Konvergenz als auch für die entscheidende Wichtigkeit des Knospungstyps ist es charakteristisch, daß die drei parasitischen Arten dem Vermehrungstyp entsprechend drei verschiedenen Familien angehören.

### Geschlechtsdimorphismus und Konjugationstyp

Äußerst interessant ist der Geschlechtsdimorphismus, der bei der Art *Urnula epistylidis* zustande kommt: der Mikrokonjugant sucht den Makrokonjuganten in Schwärmergestalt auf, siedelt an dessen Hülle an und nachher beginnt die Konjugation mittels gegenseitiger Ansätze [29]. Hier ist also der Größenunterschied der Konjuganten nicht akzidentell, wie bei den übrigen »anisogamen« Konjugationen (*Tokophrya*, *Ephelota* usw.), sondern erscheint als die Folge der Bildung des Geschlechtsschwärmers. Es ist möglich, daß die Konjugation auch bei den anderen Urnulen ähnlich ist, anderswo gibt es aber, die Discophryen ausgenommen, kein Zeichen dafür.

Nach einer früheren Ungewißheit [20] steht jetzt schon außer Zweifel [17, 22], daß der Geschlechtsdimorphismus des Genus *Discophrya*, der noch auffallender ist als der von *Urnula* und der auch mit der Veränderung des Konjugationstyps verbunden ist, nicht primär ist, keinen phylogenetischen Überrest darstellt, sondern sekundär, aus der Isogamie der entwickelten Tiere entstand. Dies wird durch die Tatsache bewiesen, daß bei den unmittelbaren Verwandten des Genus *Discophrya* die Geschlechtslebensphase in entwickeltem Zustand hervorgerufen wird und diese verwandten Genera auch in anderen Beziehungen einfacher sind als das Genus *Discophrya*. Im Genus *Discophrya*

selbst ist es durch die frühe Differenzierung des einen Geschlechts zu erklären, daß der Mikrokonjugant schon im Schwärmerzustand zu seiner Rolle determiniert wird. Die bisher angeführten Beispiele beweisen schon, daß die Veränderung in der Determination des einen Konjuganten bei der Phasenverschiebung nicht stehen geblieben ist, sondern daß weitere Veränderungen darauf folgen: der Körper ist bedeutend kleiner als der des vegetativen Schwärmers und kann sogar seine Ziliatur verlieren. Parallel mit diesen Veränderungen wird auch der Typ der Konjugation modifiziert. Von den fünf *Discophrya*-Arten, deren Konjugation schon bekannt ist, paart sich eine (*D. astaci*) durch äußere Konjugation [17] und die vier anderen (*D. buckei*, *D. elongata*, *D. collini*, *D. endogama*) durch innere Konjugation [14, 20, 22, 30]. Allein der Konjugant von *D. collini* ist zilienlos. Die neulich untersuchte Art *D. elongata* [30] ist besonders deshalb interessant, weil ihr Körperbau mit dem Typ der Discophryen mit abgeflachtem Körper übereinstimmt und damit darauf hindeutet, daß der Typ der Konjugation auch bei jenen derselbe sein muß.

Das mit einem besonderen Schwärmer und mit besonderer Metamorphose verbundene Geschlechtsleben entspricht, zumindest in dem einen Geschlecht, auch einem separaten Lebenszyklus. Es hat bei der Art *Urnula epistylidis* eine ausgeprägt vierfache Gliederung: Bildung des Geschlechtschwärmers → Schwärmerzustand → Metamorphose → Stadium des entwickelten Konjuganten. In diesem Stadium besitzt er sowohl einen Stiel als auch eine Hülle und mit seinem Konjugationsansatz konjugiert er partiell. Bei *D. astaci* ist die Lebensphase des Mikrokonjuganten auch ähnlich gegliedert, weil der Schwärmer, nach Anhaftung am Makrokonjuganten, noch eine Metamorphose ausführt, sich in ein stielloses Geschlechtsstadium mit Saugrörchen verwandelt, diese Metamorphose ist aber im Vergleich mit derselben des Genus *Urnula* schon reduziert. Bei den übrigen vier *Discophrya*-Arten zeigt sich die Metamorphose und der entwickelte Zustand schon kaum bemerklich, weil die Organelle des entwickelten Tieres (Saugrörchen, Stiel) nicht erscheinen. Die Metamorphose wird noch durch die Resorbierung der larvalen Ziliatur und durch die Abrundung des Körpers angedeutet, beim zilienlosen Mikrokonjuganten von *D. collini* ist schon nicht einmal dies nötig. Von der vierfach gegliederten Lebensphase sind nur die äußeren Züge der ersten zwei Teile erhalten geblieben.

Eine noch gründlichere Kenntnis des Lebens der Suktoren ist erforderlich, um über die Verbreitung des Geschlechtsdimorphismus und der Konjugationstypen ein endgültiges Bild zu gewinnen. Die Kenntnisse in bezug auf die Familien können in den folgenden zusammengefaßt werden:

Der ursprüngliche Konjugationstyp der Suktoren entspricht dem der Ciliaten: eine isogame, partielle Konjugation. Der ursprüngliche Typ modifizierte sich in den folgenden Richtungen:

1. Isogame, totale Konjugation, konvergent in der Familie Ephelotidae und in einigen Genera der Acinetiden. Die Anisogamie von *Ephelota* stellt einen gelegentlichen Unterschied entwickelter Konjuganten dar [2, 10].

2. Wirkliche Anisogamie mit der schwärmerzeitigen Determination des Mikrokonjuganten.

a) Partielle (temporäre) Konjugation. *Urnula epistylidis* [29].

b) Totale (endgültige) äußere Konjugation. Nach unseren mangelhaften Kenntnissen: *Discophrya astaci*.

c) Totale, innere Konjugation. *D. endogama* [20], *D. buckei* [22], *D. elongata* [30], *D. collini* [1, 14].

### Der Ruhezyklus

Einer der Verfasser (K. KORMOS) wies in einer besonderen Arbeit darauf hin [28], daß in drei Familien der Suktoren (Podophryidae, Acinetidae, Ophryodendridae) die Enzystierung einem totalen Lebenszyklus entsprechend vonstatten geht, und zwar in zwei Phasen und in zwei Stadien gegliedert (Schwärmerbildung → zystenbildender Schwärmer → Metamorphose → Zyste). Der zystenbildende Schwärmer ist von dem Schwärmer des trophischen Stadiums verschieden und variiert sich auch unabhängig davon; auf dieselbe Weise verändert sich auch der Ruhezustand von dem trophischen Stadium unabhängig, besonders was den Stiel betrifft. Wir wissen noch nicht, ob das konvergente Auftreten dieser beiden Lebenszyklen für alle Genera der drei Familien charakteristisch ist und wie groß sein kategorisierender Wert ist, seine phylogenetische Wichtigkeit ist aber offenbar. Besonders wird dies vom Genus *Tachyblaston* bewiesen, es ist nämlich gerade sein Ruhestadium, das eine Homologie mit dem trophischen Schwärmer, mit dem Knospungstyp und mit dem lorica-artigen Hüllengebilde von *Thecacinetia* aufweist. Es soll dahingestellt bleiben, ob die Entwicklung des Ruhezyklus und in Verbindung damit ein bei anderen Protozoen noch unbekannter Typ der Zystenbildung sich als eine konvergente Eigenschaft von Genera, oder als die von Familien erweist, soviel ist aber gewiß, daß sie sowohl in der Bestimmung der systematischen Kategorien als auch in der Klärung von phylogenetischen Beziehungen eine außerordentlich große Hilfe bedeutet. Ein besonderer Ruhezyklus ist bisher in den folgenden Genera bekannt: *Podophrya*, *Sphaerophrya*, *Metacineta*, *Acineta*, *Tachyblaston*, *Parapodophrya*. Selbst wenn wir die kleine Familie der Ephelotiden und der Dendrocometiden nicht erwägen, auch dann ist es sofort ziemlich auffallend, daß wir bei den Discophryiden nicht nur eine sich mittels Metamorphose entwickelnde Zyste, sondern überhaupt keine Dauerzyste kennen. Dies weist schon auch hinsichtlich der Lebenszyklen auf die frühe Divergierung der Familie hin.

### Wertung der konvergenten Eigenschaften

Nach der Untersuchung der konvergenten und divergenten Züge können die folgenden zusammenfassenden Fragen auch separat aufgeworfen werden:

1. Was ist die Reihenfolge der Wichtigkeit der Merkmale hinsichtlich der Kategorisierung und der phylogenetischen Wertung?

In der Rangordnung der kategorisierenden Merkmale werden die ersten drei Plätze durch die folgenden belegt: *a.* Knospungstyp, *b.* Struktur der Saugröhren, *c.* Struktur des Schwärmers. Die abgrenzenden Merkmale der Familien werden in erster Linie vom Knospungstyp und von der Struktur der Saugröhren geliefert.

2. Gibt es ein kategorisierendes Merkmal erster Ordnung, das auf konvergente Weise nie auftritt?

Die Struktur der Saugröhren weist auch mehrere konvergente Veränderungen auf (trichterartige Saugröhren, Röhren mit schwankender Bewegung) und die konvergenten Veränderungen der Schwärmer sind sogar sehr häufig. Von den Knospungstypen ist es die äußere und die invaginative Knospung, die zur Konvergenz eine Möglichkeit bietet. In der Beziehung der Discophryiden und Dendrocometiden verhält sich das Problem, wie folgt. Die Dendrocometiden stammen entweder von einem, mit den Discophryiden gemeinsamen Vorfahren ab, dessen Knospung schon invaginativ war, oder von den Discophryiden selbst, oder sie entwickelten sich und erwarben die Fähigkeit der invaginativen Knospung auf einem unabhängigem Wege. Von einem konvergenten Auftreten kann nur im dritten Falle die Rede sein. Obwohl gewisse Übereinstimmungen sowohl zwischen den Schwärfern als auch zwischen den entwickelten Tieren gefunden werden können [17], sind diese identischen Züge selbst von konvergenter Natur, deshalb bleibt der Ursprung der Dendrocometiden und das konvergente Auftreten der invaginativen Knospung auch weiterhin eine offene Frage. Prinzipiell ist die phylogenetische Möglichkeit der konvergenten Entwicklung der Knospungstypen ebenso vorhanden, wie es bei jeder beliebigen anderen Eigenschaft der Fall ist. Bis Übergangsformen gefunden werden, ist es z. B. auch vorstellbar, daß die Gruppen *Paracineta* und *Physaliella* auf einem anderen Wege zur invaginativen Knospung gelangten als die übrigen Discophryiden.

3. In den phylogenetischen Folgerungen spielen die larvalen, atavistischen Stadien oft eine große Rolle. Es fragt sich, ob das Schwärmerstadium ein konservatives Stadium ist, das die Struktur des ursprünglichen Ciliaten-Vorfahren bewahrt, oder aber es selbst einen bedeutend modifizierten Organismus darstellt.

Es steht außer Zweifel, daß die Mehrheit der Schwärmer nicht nur für den Ciliaten-Ursprung spricht, sondern auch auf die Züge der Ordnung Gymnostomata näher hindeutet. Trotzdem gelingt es erst nach gründlicher Überle-

gung den Gymnostomata-Typ anzugeben, von dem die Suktiorien stammen, oder festzustellen, ob ein oder mehrere Typen als Ausgang dienten. Die Feststellung der ursprünglichen Typen wird eben dadurch erschwert, daß der bedeutende Teil der larvalen Eigenschaften sich je nach Familien konvergent modifiziert und die Modifikation das Auftreten solcher neuen Eigenschaften ergibt, die schon in der Ordnung Gymnostomata vorhanden sind. Ohne Kenntnisse über die Entwicklung dieser Eigenschaften kann man — in engerem Sinne — auch an einen polyphyletischen Ursprung denken. Der Bau der Suktiorien-Schwärmer kann — der terminalen, ventralen und lateralen Lage der Scopula entsprechend — mit der Gruppe Pro-, Hypo-, und Pleurostomata verglichen werden. Einige Schwärmertypen, die eine vordere stielbildende und eine hintere Haftscopula besitzen, weisen mit der Familie Dysteriidae, innerhalb deren mit dem Genus *Trichopus*, einen überraschend ähnlichen Bau auf, der schon beinahe eine Verwandtschaft zu sein scheint [7, 17]. Da aber die Entwicklung dieser eigenartigen Schwärmer-Typen in den einzelnen Familien der Suktiorien voneinander unabhängig, ja sogar innerhalb desselben Genus, festgestellt werden kann, ist die phylogenetisch unabhängige Konvergenz offenbar. In einem gewissen Sinne bedeutet aber auch diese Konvergenz eine Art Verwandtschaft. Sie deutet nämlich an, daß die Schwärmer der Suktiorien noch auf der Suktiorien-Stufe die Fähigkeit gleichen Inhalts der phylogenetischen Modifikation besitzen wie die Ordnung Gymnostomata, von der sie abgeleitet werden können. Wie bei der Ordnung Gymnostomata die Hypostomata- und Pleurostomata-Typen von der Gruppe Prostomata abgeleitet werden, ebenso können die übrigen Schwärmertypen auf die Modifikation des Schwärmertyps von monaxoner Symmetrie zurückgeführt werden. Die Modifikation der Schwärmertypen wiederholt sich zwar innerhalb der größeren Familien auch auf konvergente Weise, in der Familie Ephelotidae ist jedoch nur ein einziger Schwärmertyp vorhanden, der gerade die modifizierte Varietät mit doppelter Scopula darstellt. Die entwickelte, trophische Organisation dieser Familie dürfte sich bereits im Besitz dieses modifizierten Schwärmertyps gebildet haben, während die Schwärmertypen der größeren Familien sich erst nach dem Erreichen der charakteristischen trophischen Organisation der Familien modifiziert hatten und dementsprechend ist der Schwärmertyp bei aller Ähnlichkeit des entwickelten Organismus sogar innerhalb desselben Genus verschieden.

Aus den Obigen geht es klar hervor, daß selbst der Schwärmer vom entwickelten Organismus unabhängige Veränderungen durchmacht. Diese sekundäre Veränderung ist in gewissen Beziehungen von gleichem Maße und Charakter wie die Veränderungen der entsprechenden Ciliaten selbst. In gewissen Richtungen weisen sie aber noch stärkere Modifikationen auf und sie können auch charakteristische Ciliaten-Merkmale verlieren. Die Schwärmer besitzen eine eigene von den entwickelten, trophischen Organisationen unabhängige

Phylogenetik, die zu einer Modifikation führen kann, deren Wert nach Größenordnung dem Wert des entwickelten Organismus gleich ist und die sich an und für sich sogar über die Kategorie der Ordnung erstrecken kann. Besonders schön wird dies vom Spanner-Schwärmytyp der Familie Ophryodendridae bewiesen, dessen Entwicklung in ihren wesentlichen Phasen innerhalb der Familie verfolgt werden kann und die an und für sich eine Veränderung solcher Natur darstellt (nach dem Verlieren der Zilienbewegung und der Zilien folgt die Entwicklung der spannenden Bewegung), die die Variabilitätsrahmen der Ordnung Gymnostomata weit überschreitet. Wenn wir den Bewegungstyp der Ciliaten mit dem der Turbellarien vergleichen, so ist die Bewegung des Spanner-Schwärmers den Blutegeln ähnlich und die Veränderung des Bewegungstyps stellt in der Tat einen Schritt von entsprechender Größenordnung dar. Dadurch wird es am besten gezeigt, was für einer außerordentlichen phylogenetischen Veränderung das »atavistische« Larvenstadium fähig ist.

Die konvergenten Veränderungen der Schwärmer und die gegenseitige Beziehung der Knospungstypen deuten auch in der Phylogenetik der Suktiorien-Familien auf einen konvergenten Ursprung hin, auf einen Ursprung, der je nach Familien auf den *Podophrya*-Typ zurückgeführt werden kann [26]. Darüber hinaus machen diese darauf aufmerksam, daß ähnliche konvergente phylogenetische Richtungen auch innerhalb der Ciliaten wahrscheinlich sind. Hier sei nur ein Beispiel von unmittelbarer Beziehung erwähnt. Wenn man an die Veränderungen der Suktiorien-Schwärmer denkt, dann ist es viel richtiger, die drei Familien der Gruppe »Rhynchodea« (*Ancistrocomidae*, *Hypocomidae*, *Sphaenophryidae*), die zu den Thigmotrichen gerechnet wurden, in die Ordnung Gymnostomata einzureihen. Der Typ der Ziliatur paßt in diese Ordnung gut hinein, denn die thigmotaktische Ziliengruppe ist keine spezielle Eigenschaft der Thigmotrichen, sondern ein häufiger konvergenter Zug und der Ursprung des Saug-Tentakels ist ein mit dem Saugröhren der Suktiorien konvergentes Problem. Die Reduktion der Ziliatur, in Verbindung damit die Entwicklung der Knospung von den Gymnostomaten angefangen bis an die Rhynchodeen (*Sphaenophryidae*) stellt eine Veränderung dar, die mit der von den Gymnostomaten bis an die Suktiorien (*Podophryidae*) dauernden, ähnlichen Veränderung konvergent ist. Diese Veränderung kann nur dann als Konvergenz betrachtet werden, wenn es bewiesen wird, daß die Saugtentakel der Rhynchodeen mit dem Saugröhren der Suktiorien nicht homolog sind. Im Falle von Homologie wäre bei den Suktiorien eine neue systematische Gruppierung erforderlich. Das Problem ist jedenfalls für die endgültige Lösung reif geworden.

In einer anderen Arbeit haben wir darauf hingewiesen, daß selbst die Suktiorien-Familien von der Gruppe Podophryidae abgeleitet werden können, den Zellteilungstypen entsprechend, die sich aus der heteromorphen Zellteilung entwickeln. Dies bedeutet auch soviel, daß die

Reihenfolge der Familien weder in systematischem, noch in phylogenetischem Sinne eine besondere Bedeutung hat, gerade deswegen, weil sie sich divergent entwickelt haben [26]. Wenn wir trotzdem darauf bestehen, die Familien in irgendeiner »natürlichen« Reihe aufzuzählen, dann ist es am richtigensten, die Reihenfolge zu wählen, die der Spezialisierung der Zellteilungstypen entspricht. Diese Reihenfolge ist die folgende: Heteromorphe Zellteilung, äußere Knospung (sie tritt konvergent auch in anderen Ciliophoren-Gruppen auf), invaginative Knospung (in anderen Ciliophoren-Gruppen ist sogar sein sporadisches Auftreten ungewiß), circumvaginative Knospung (eine ausschließliche Suktiorien-Eigenschaft). In der Reihenfolge der Familien Discophryidae und Dendrocometidae besteht der entscheidende Faktor darin, daß das Fehlen der Saugrörchen der Discophryiden eine sekundäre Erscheinung ist. Da die anderen Eigenschaften sich vom Zellteilungstyp unabhängig verändern, ist es verständlich, daß einige Familien, die in manchen Merkmalen mehr differenziert sind, in der Reihe verhältnismäßig vorrücken. So belegen die Ephelotiden den zweiten Platz, obwohl ihr Saug-Fangapparat unter den Suktiorien am eigenartigsten ist und die Ophryodendriden den dritten Platz, obwohl die Schwärmer mancher ihrer Genera am meisten modifiziert sind. Die richtige Reihenfolge der Familien ist daher die folgende:

1. Podophryidae,
2. Ephelotidae,
3. Ophryodendridae,
4. Discophryidae,
5. Dendrocometidae,
6. Acinetidae.

Zwei von den sechs Familien (Ephelotidae, Dendrocometidae) divergieren nicht derart weiter, daß sie sogar als Genus-Gruppen in separate systematische Kategorien geteilt werden könnten. Bei den Podophryiden liefert das *provisorisch* eingeordnete Genus *Ophryocephalus* Gelegenheit dazu (durch sein Saugrörchen und durch seine multilokale simultane Knospung), zwei Genus-Gruppen aufzustellen. Gruppe 1: *Podophrya*, *Sphaerophrya*; Gruppe 2: *Ophryocephalus*.

Die charakteristischen Genera der Familie Ophryodendridae können je eine Gruppe darstellen, die jede für sich divergiert.

Die Genera, die eine Divergenz aufweisen, sind: *Parapodophrya*, *Thecacincta*, *Tachyblaston*, *Spelaeophrya*, *Dendrosomides*, *Ophryodendron*.

Die Familie Discophryidae kann je nach dem Schwärmerstyp, dem Geschlechtsdimorphismus und dem Konjugationstyp in drei Genus-Gruppen gegliedert werden. Gruppe 1: *Paracineta*, *Physaliella*; Gruppe 2: *Caracatharina*, *Cyclophrya*; Gruppe 3: *Discophrya*.

Die Familie Acinetidae kann nach dem halb oder ganz entwickelten circumvaginativen Charakter der Knospung in zwei Gruppen geteilt werden:

Gruppe 1: Die Knospung ist semi-circumvaginativ (*Metacineta, Urnula*) ; Gruppe 2: Die Knospung ist circumvaginativ. Zu dieser Gruppe gehören die Genera der alten Familien Acinetidae und Dendrosomidae. Die Einordnung dieser Genera in zwei separate Familien war dermaßen unbegründet, und sie weisen ein derartig graduelles Nebeneinander auf, daß sie zur Einordnung in separate Gruppen kaum Gelegenheit geben.

#### LITERATUR

1. CANELLA, M. F. (1957) Studi e recherche sui Tentaculiferi nel quadro della biologia generale. *Ann. Univ. Ferrara, Sez. III*, **1**, 259—716.
2. COLLIN, B. (1912) Étude monographique sur les Acinétiens. II. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, **51**, 1—457.
3. FAURÉ-FREMIET, E. (1945) *Podophrya parasitica* n. sp. *Biol. Bull. Belg.*, **79**, 85—97.
4. FAURÉ-FREMIET, E., GUILCHER, Y. (1947) Les affinités des Infusoires acinétiens et la ciliature de leurs fermes vagiles. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **72**, 12—16.
5. FAURÉ-FREMIET, E. (1950) Morphologie comparée et systématique des Ciliés. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **75**, 109—122.
6. FAURÉ-FREMIET, E. (1952) La diversification structurale des Ciliés. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **77**, 274—281.
7. FAURÉ-FREMIET, E. (1957) *Trichopus lachmanni* n. sp.; structure et morphogenèse. *J. Protozool.*, **4**, 145—150.
8. GOODRICH, J., JAHN, TH. L. (1943) Epizoic Sucteria from turtles. *Trans. Amer. Microsc. Soc.*, **62**, 245—253.
9. GRELL, K. G. (1950) Der Generationswechsel des parasitischen Suctors *Tachyblaston ephelotis* MARTIN. *Z. Parasitenk.*, **14**, 499—534.
10. GRELL, K. G. (1953) Die Konjugation von *Ephelota gemmipara* R. HERTW. *Arch. Protist.* **98**, 287—326.
11. HADŽI, J. (1940) Neue symphorische Suktiorien: *Spelaeophrya polypoides* sp. n., *Sp. lacustris* sp. n. und deren Entwicklungsreihen. *Bull. Acad. Sci. Belgrade*, **6B** 45—56.
12. KAHL, A. (1931) Über die verwandtschaftlichen Beziehungen der Suktiorien zu den prostomiden Infusorien. *Arch. Protist.*, **73**, 423—481.
13. KAHL, A. (1934) Suktoria. In GRIMPE, WAGLER, Tierwelt der Nord- und Ostsee, **26**, 184—226. Leipzig.
14. KORMOS, J. (1935) *A Prodiscophrya Collini* (Root) ivari kétalakúsága és konjugációja. Geschlechtsdimorphismus und Konjugation bei *Prodiscophrya Collini* (Root). *Állatt. Közl.*, **32**, 152—168. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
15. KORMOS, J. (1938) Fejlődéstaní vizsgálatok a Szívókásokon (Suktoria). Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Suktiorien. *Mat. Term. Közl.*, **38** (1), 1—95. (Nur ungarisch.)
16. KORMOS, J. (1938) A Szívókások (Suktoria) szívócsöveinek szerkezete és működése. Bau und Funktion der Saugröhren der Suktiorien. *Állatt. Közl.*, **35**, 130—153. (Ungarisch, deutsche Zusammenfassung.)
17. KORMOS, J. (1958) Phylogenetische Untersuchungen an Suktiorien. *Acta Biol. Hung.*, **9**, 9—23.
18. KORMOS, J. (1958) Experimentelle Untersuchung des Knospungsgradienten. *Acta Biol. Hung.*, **9**, 105—128.
19. KORMOS, J. (1960) Remarks on two Discophryidae. *J. Protozool.*, **7**, Suppl. 22.
20. KORMOS, J., KORMOS, K. (1956) Neue Untersuchungen über den Geschlechtsdimorphismus bei Prodiscophryen. *Acta Biol. Hung.*, **7**, 109—125.
21. KORMOS, J., KORMOS, K. (1956) Die entwicklungsgeschichtlichen Grundlagen des Systems der Suktiorien. *Acta Zool. Hung.*, **3**, 147—162.
22. KORMOS, J., KORMOS, K. (1958) Äußere und innere Konjugation. *Acta Biol. Hung.*, **8**, 103—126.
23. KORMOS, J., KORMOS, K. (1958) Die Zellteilungstypen der Protozoen. *Acta Biol. Hung.*, **8**, 127—148.

24. KORMOS, J., KORMOS, K. (1958) Determination in der Entwicklung der Protozoen II. *Acta Biol. Hung.*, **9**, 25—45.
25. KORMOS, J., KORMOS, K. (1958) Über die *Pseudogemma*-Frage. *Acta Zool. Hung.*, **4**, 157—167.
26. KORMOS, J., KORMOS, K. (1960) A Suctoriák rajzostádiumának jelentősége a filogenetisben és a rendszerezésben. Bedeutung des Schwärmerstadiums in der Phylogenetik und Systematik der Suctorien. *Allatt. Közl.*, **7**, 97—104. (Ungarisch.)
27. KORMOS, K. (1958) Die Biologie von *Urnula*. *Acta Zool. Hung.*, **4**, 167—189.
28. KORMOS, K. (1960) Ruhezustand bei Protozoen mittels Metamorphose. *Acta Biol. Hung.*, **11**, 255—269.
29. KORMOS, K. (1960) New data concerning the biology of *Urnula*. *J. Protozool.*, **7**, Suppl. 22.
30. KORMOS, K. (1960) Anisogamy of the *Discophrya elongata*. *J. Protozool.*, **7**, Suppl. 22.
31. KORMOS, K. (1960) The formation of the swarmer of *Parapodophrya* and its relationship. *J. Protozool.*, **7**, Suppl. 22.
32. MATTHES, D. (1956) *Thecacinetidae nov. fam.* und ihre Fortpflanzung durch Vermoid-Schwärmer. *Arch. Protist.*, **101**, 477—528.
33. NIE, D., LU, K. S. Y. (1945) Studies on *Spathocyathus caridina* gen. et sp. nov., a suctorian attached to the antennae of a fresh-water shrimp, *Caridina* sp. *Sinensis*, **16**, 57—64.
34. NOZAWA, K. (1938) Some new fresh-water Suctoria. *Annot Zool. Jap.*, **17**, 247—259.
35. PENARD, E. (1920) Études sur les Infusoires Tentaculifères. *Mém. Soc. Phys. Hist. Nat. Genève*, **39**, 131—229.
36. ROUILLER, C., FAURÉ-FREMIET, E., GAUCHERY, M. (1956) Les tentacules d'*Ephelota*; étude au microscope électronique. *J. Protozool.*, **3**, 194—200.
37. SCHULTZ, E. (1938) Beiträge zur Kenntnis mariner Suctorien, VIII. *Kieler Meeresf.*, **2**, 354—355.
38. STAMMER, H. J. (1936) Zwei neue troglobionte Protozoen: *Spelaeophrya troglcaridis* n. g., n. sp. von den Antennen der Höhlengarnele *Troglcaris schmidti* DORM. und *Lagenophrys monolistrae* n. sp. von den Kiemen (Pleopoden) der Höhlenasselglattung *Monolistra*. *Arch. Protist.*, **84**, 518—527.

#### A PHYLOGENIC EVALUATION OF CONVERGENT AND DIVERGENT PROPERTIES IN SUCTORIA

Comparing various families of Suctoria, the paper examines the phylogenetic significance and taxonomic value of convergent and divergent changes regarding the production of larvae, organization of adults, mode of life and particular phases of life.

Important basic types of cell division, the most conspicuous changes of organs, the appearance of loricae and exceptional modifications of the larvae can be observed only in certain families. Most features characteristic of larval and adult organization, manner of life and special phases of life show, however, a convergence not merely within families but also within particular genera and even within species, so that these features have but a rather limited value from a phylogenetic point of view. All properties evaluated seem to prove that, while a closer genetic correlation may possibly exist between the families of the Discophryidae and of the Dendrocometidae, the other five suctorial families must be regarded as having derived from Podophryidae according to the laws of divergence.

Phylogenetic modifications based on fundamental types of cell division and on types of larvae are also substantiated by the evidence of other properties. The most noteworthy are: (a) Elimination of the non-congeneric members of the family of Podophryidae. (b) Classification of the genera *Parapodophrya*, *Thecacinetidae* and *Tachyblaston* in the family Ophryodendridae; the establishment of the families Tachyblastonidae GRELL and Thecacinetidae MATTHES seem to be unnecessary. (c) Definite unification of the families Acinetidae and Dendrosomidae. (d) Transfer of the genera *Paracineta* and *Physaliella* into the family Discophryidae and of the genera *Urnula* and *Metacineta* into the family Acinetidae.

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КОНВЕРГЕНТНЫХ И ДИВЕРГЕНТНЫХ СВОЙСТВ У СОСУЩИХ ИНФУЗОРИЙ

В статье исследуется на основе сравнения семейств Suctoriae филогенетическое значение и категорионная ценность конвергентных и дивергентных изменений телосложения и образования бордяжек, развитой организации, образа жизни и жизненных фаз.

Важные основные типы деления клеток, самые поразительные изменения сосущих трубок, появление открыто окаймленного панциря (*Iorica*), необычные модификации бордяжек, наблюдаются только у отдельных семейств. Однако, большинство черт личиночной и взрослой организации, образа жизни и жизненных фаз появляется не только в семействах, но и в родах, а иногда даже в видах конвергентным образом, и поэтому при филогенетической оценке они применимы только весьма ограничено. Оценка всех свойств также доказывает, что остальных пять семейств *Suctoria* дивергентно можно производить от *Podophryidae*; только между семействами *Discophryidae* и *Dendrocometidae* можно предполагать (но не доказать) более прямую генетическую связь.

Филогенетические модификации, проведенные на основе основных типов деления клеток и типов бордяжек, подтверждаются также оценкой остальных свойств. Важнейшие из них: а) Выключение гетерогенных членов семейства *Podophryidae*. б) Причисление родов *Parapodophrya*, *Thecacinetia* и *Tachyblaston* к семейству *Ophryodendridae*. Выдвижение семейств *Tachyblastonidae* GRELL и *Thecacinetidae* MATTNES является излишним. в) Окончательное объединение семейств *Acinetidae* и *Dendrosomidae*. г) Причисление родов *Paracineta* и *Physaliella* к семейству *Discophryidae*, а родов *Urnula* и *Metacineta* к семейству *Acinetidae*.

JÓZSEF KORMOS, Szeged, Aradi vértanúk tere 1, Ungarn.

KATALIN KORMOS, Szeged, Aradi vértanúk tere 1, Ungarn.

# WINTER DORMANCY OF HUNGARIAN TREES AND SHRUBS

## I. TREES AND SHRUBS OF NATURAL GROVES

VERA KÁRPÁTI and I. KÁRPÁTI

BOTANICAL RESEARCH INSTITUTE OF THE HUNGARIAN ACADEMY OF SCIENCES, VÁCRÁTÓT  
(HEAD: I. KÁRPÁTI)

(Received May 15, 1960)

### Summary

The study of the dormancy of trees growing in woods and natural groves in Hungary forms part of a synoecological research work conducted for ten years. The material, collected systematically at regular intervals, was examined under laboratory conditions by performing daily counts in thermostats kept at different temperatures (+5, +10, +15, +20, +25, +30° C).

The first series of experiments had the object to determine the role of temperature in the breaking of dormancy. Characteristic features in the behaviour of Hungarian indigenous grove-trees species dormancy allow their division into two main groups:

1. *Trees and shrubs hibernating in a state of forced total or partial dormancy.* These are in a condition of forced rest during winter and can as a rule be induced to sprout at any time. This category includes *Frangula alnus* MILL., *Sambucus nigra* L., *Populus nigra* L., *Rubus caesius* L., *Cornus sanguinea* L.

2. *Trees and shrubs hibernating in a state of natural deep dormancy.* These have a higher or lower "chilling requirement" during the winter season and need a period of rest, the length and degree of which depend on the species, on the habitat, age and other individual factors. Heat and light effects, whatever their intensity, produce in this period but a very low rate of sprouting. To this category belong *Alnus glutinosa* (L.) GÄRTN., *Alnus incana* (L.) MÖNCH., *Quercus robur* L., *Populus alba* L., *Populus canescens* Sm., *Salix alba* L., *Salix purpurea* L., *Salix triandra* L., *Fraxinus angustifolia* VAHL., *Ulmus campestris* L., *Crataegus monogyna* JACQ., *Rosa canina* L., *Viburnum opulus* L.

### Introduction

In the course of the large-scale synoecological research work now in progress [23, 24], particular attention is paid to the laws governing the winter rest of the trees and shrubs examined. Oecological and coenological investigations in the field are supplemented by experiments in the laboratory. The initial results of these researches form the subject of this presentation.

A thorough examination of the rest period and its changes, supported by experimental results, is indispensable in order to gain a satisfactory knowledge of the cyclic rhythm observed in plant associations and the various types of woodland and grassland. Our present notions concerning the winter rest period are far from satisfactory either in connection with the general dynamics of vegetation or in regard to particular plant species, especially those of Europe.

Under our climatic conditions there are two significant annual rest periods.

1. *The dry period of summer* during which species not resistant to drought become dormant or reduce their vital functions. Especially well adapted seems to be in this respect the majority of therophytes (Th) and hemitherophytes (TH) which survive the unfavourable season (generally speaking, June—July—August in Hungary) in the form of seeds. The overground parts of some species, the geophytes (G) perish or withdraw to the soil, while certain plants of another way of life protect themselves against the conditions of the rainless season by leaf-fall.

2. *The winter period with temperatures around or below the freezing point* lasts from November to March. Remaining in the form of seed or bud, certain species protect themselves by an almost complete interruption of vital functions.

Our investigations enabled us to study closely the various types of winter dormancy in certain plants indigenous to Hungary. The photo- and thermoperiodism as also the dormancy of plants have been investigated by a good many authors of West and Central Europe [4, 7, 12, 19, 24, 26, 36, 38, 42, 45, 50, 55, 56], by a great number of Soviet workers [1, 2, 3, 6, 9, 21, 32, 44, 48] and are abundantly treated also in the English literature [10, 11, 14, 18, 20, 25, 34, 35, 39, 40, 51, 52, 53]. Investigating the factors responsible for the cessation of the growth of seeds and buds, SAMISH [40] distinguishes two types of dormancy:

1. "quiescence" caused by external conditions *i. e.* unfavourable temperature, water supply etc.;

2. "rest" caused by internal (endogenous) factors. The entrance into rest is usually preceded by a stage of quiescence brought about by conditions unfavourable to growth or due to correlative inhibition and goes over into "preliminary rest", an early stage during which the dormant bud will no longer grow in response to favourable conditions, but can be easily "forced" by subjection to cold or heat, treatment with anaesthetics etc. During "mid-rest", only the most drastic treatments will start a growth which will even then be weak as compared with either "preliminary" or the following "after-rest". The latter may be followed by another period of quiescence. Experimental results can be better appreciated if these distinctions, disregarded by many authors, are borne in mind.

DIELS [12] proceeds on the assumption that periodic phenomena in plants follow periodic changes of the climate. He conducted experiments with the object of ascertaining the laws that govern phytogeography and zonal geography of particular plant species. He made his experiments in natural environment (at Hangelstein, near Giessen, 1912), in a mixed forest (without reporting on the composition of the association) and in a greenhouse. He studied the life-rhythm of the members of the examined plant association and distinguished three main types of dormancy:

- “1. aperiodische Arten mit gänzlich erzwungener Ruhezeit (*Asperula*-Typus) (Fig. 1);  
 2. periodische Arten mit teilweise erzwungener Ruhezeit (*Leucojum*-Typus) (Fig. 2);  
 3. periodische Arten mit harmonischer Ruhezeit (*Polygonatum*-Typus) (Fig. 3)” [12. p. 349].

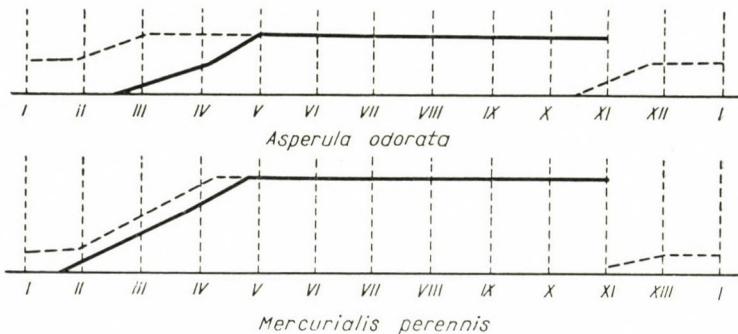


Fig. 1. Rhythm of *Asperula* type (after DIELS)

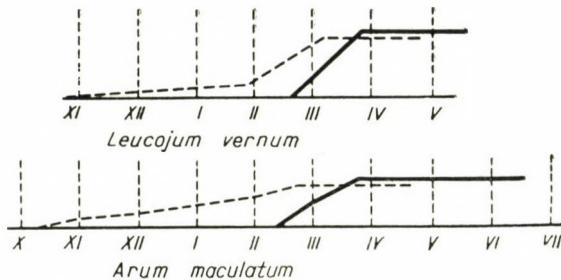


Fig. 2. Rhythm of *Leucojum* type (after DIELS)

Hungarian indigenous trees belong mostly to DIELS' second category and have, as a rule, to be subjected to a definite degree of chilling for the termination of winter dormancy. There exist according to our data also such species, indigenous to Hungary, as need adequately low unfavourable temperature to induce quiescence. These species can be caused to bud even without exposure to cold, immediately after defoliation. About 10 per cent of the 123 ornamental trees and shrubs studied by MOROZ [32] could be induced to sprout at a rate of 80 to 100 per cent immediately after leaf-fall and without exposure to cold (e. g. certain species of the genera *Berberis*, *Lonicera*, *Spirea*, *Physocarpus*, *Caragana*, *Syringa* and *Betula*). There exist, on the other hand, numerous species of trees and shrubs which, in agreement with literature and our

own investigations, need a period of cold for 15 to 60 days before terminating their rest when initiation of growth is possible.

Thus the duration of winter dormancy depends on both endogenous properties of the species and conditions of the biotope.

MOROZ [32] affirms that there exist certain trees and shrubs (*e. g.* *Fagus silvatica*, *Corylus avellana*) whose winter rest is not affected by conditions of the biotope. Again, other species display a more or less uniform behaviour

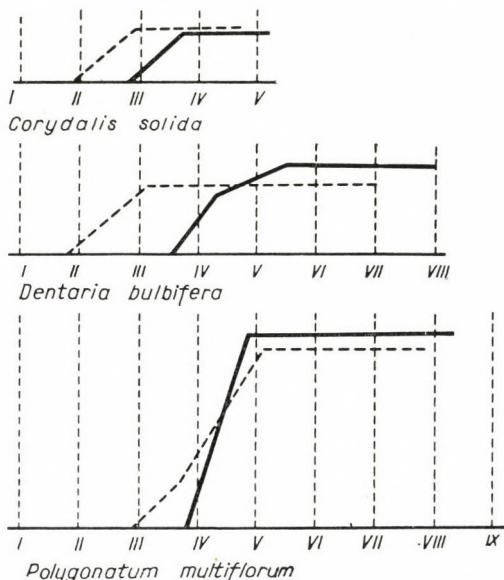


Fig. 3. Rhythm of *Polygonatum* type (after DIELS)

in different habitats, although in species of southern origin vegetative buds are sprouting somewhat later than in those of northern origin.

*Photoperiodism* constitutes a significant factor in the dormancy of plants. WAREING [52, 53] discusses this subject very thoroughly. Data adduced by him show that short-day treatment generally induces winter dormancy, in buds surviving the winter, while the beginning of the rest period is delayed if the length of daylight exceeds a certain critical value. Of course, this rule has no universal validity although it is supported by a fair number of experimental results.

*Photoperiodism* plays a significant role also in the breaking of dormancy in buds. Summer quiescence can be easier broken by long-day treatment than winter rest. Dormant buds of the *Fagus silvatica* can, according to WAREING [53] and KLEBS [24], be induced to grow at any time by being exposed to continuous illumination. Photoperiodic stimulus seems to be taken up by the meristematic tissue of leaf and internodal primordia.

## Methods

Our experiments concerning winter dormancy were conducted in the years 1956–1959.

As a part of these experiments, several series of woody plants, collected in the botanical garden of this Institute, were tested for their chilling requirement during the winter 1956–57. Results obtained by MÁNDY and I. KÁRPÁTI [27] facilitate comparisons in regard to definite points of time. They show the optimum temperatures at which each examined species starts to successfully develop budding in a definite phase of dormancy (autumnal quiescence, i. e. the phase of hardening; preliminary rest, mid rest, after rest, the latter period followed sometimes by a second quiescence). However, the results of these informative experiments do not justify general conclusions applicable to any part of the winter rest period. The length of the several phases also depends, as will be seen, on the species of the examined plants. Seeing that different degrees of temperature are operative at various times of the winter dormancy, it would be mistaken to regard results obtained at a certain given phase as generally valid.

The experiments referred to in the preceding paragraph were made simultaneously with our three-year experiments (1956–59) in which trees and shrubs growing in natural groves were studied in respect of the march types and of their rest period and the factors inducing it. Oecological, coenological and phenological assessments were supplemented by concurrent laboratory experiments. Equally-developed and equally-exposed shoots with unimpaired buds were cut off well-developed trees and shrubs of the various species. After adjusting them under water to equal length (25 cm) in the laboratory, we placed the shoots in glass cylinders filled (to a height of 3 cm) with distilled water of the required temperature. The latter was 5, 10, 15 and 20° C, with 50 shoots per species at each level. Except during the daily recording of 4 to 5 minutes, the test material was kept in darkness. The experiments lasted from March 8 to April 5, 1956, from November 27, 1957 to April 10, 1958 and from November 19, 1958 to April 10, 1959.

## Habitat

Test material was collected from both the lower and the upper level of the flood area of the Danube at Sződliget. The stands (soil, microclimatic and coenological conditions of each sampling place) were assessed with full particulars.

We collected our material from the following plant associations:

I. *Riparian willow grove (Salicetum triandrae MALC. 1929):*

- 1) *Salix triandra* L.
- 2) *Salix purpurea* L.

II. *Willow-poplar grove (Salicetum albae-fragilis ISSLER, 1926)*

- 3) *Salix alba* L.
- 4) *Populus nigra* L.
- 5) *Rubus caesius* L.

III. *Elm-ash-oak grove (Querceto-Ulmetum hungaricum Soó, 1955)*

- 6) *Crataegus monogyna* JACQ.
- 7) *Rosa canina* L.
- 8) *Frangula alnus* MILL.
- 9) *Cornus sanguinea* L.
- 10) *Sambucus nigra* L.
- 11) *Viburnum opulus* L.
- 12) *Fraxinus angustifolia* VAHL.
- 13) *Ulmus campestris* L.
- 14) *Alnus incana* (L.) MÖNCH.
- 15) *Alnus glutinosa* (L.) GÄRTN.
- 16) *Quercus robur* L.
- 17) *Populus alba* L.
- 18) *Populus canescens* SM.
- 19) (*Populus canadensis* MÖNCH. var. *marilandica* REHDER cultiv.)

Except No. 19 — which, though not indigenous, is widespread in Hungary — all these trees and shrubs are indigenous.

Test shoots were always taken from the same marked tree or group of shrubs.

Dimensions of the trees examined are shown in Table 1.

Table 1

Species	Height of tree in m	Diameter of stem in cm
<i>Crataegus monogyna</i> .....	3	—
<i>Rubus caesius</i> .....	0.8	—
<i>Rosa canina</i> .....	2	—
<i>Frangula alnus</i> .....	2.5	—
<i>Cornus sanguinea</i> .....	2.5	—
<i>Sambucus nigra</i> .....	3	—
<i>Viburnum opulus</i> .....	3	—
<i>Fraxinus angustifolia</i> .....	9	10
<i>Ulmus campestris</i> .....	10	12
<i>Alnus incana</i> .....	10	15
<i>Alnus glutinosa</i> .....	7	10
<i>Quercus robur</i> .....	14	15
<i>Populus alba</i> .....	15	15—20
<i>Populus canescens</i> .....	20	25
<i>Populus nigra</i> .....	20	25
<i>Populus canadensis</i> var. <i>marilandica</i> .....	15	17
<i>Salix alba</i> .....	16	25
<i>Salix triandra</i> .....	3	—
<i>Salix purpurea</i> .....	2.5	—

### Weather conditions during the winter rest period 1958—59

Especial importance attaches to meteorological factors in the study of winter dormancy. Climatic conditions have to be observed not merely during the rest period but through the entire annual period since the phase of autumnal hardening is not without influence on the plants' behaviour during the winter rest. Most decisive is the effect of temperature. Many species have a definite chilling requirement for the termination of winter dormancy.

We obtained our data concerning temperature conditions during the rest period from the meteorological station of the Agricultural Secondary School at Vác which lies at a distance of about 5 km from Sződliget where the test material was collected.

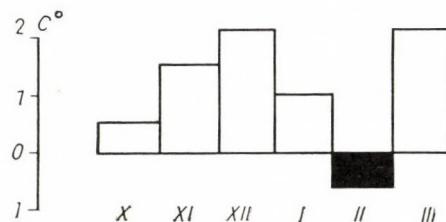


Fig. 4. Deviation of monthly mean values of temperature between October 1, 1958 and March 31, 1959, from the mean value of 50 years. (Data received from the Meteorological Station of the Agricultural Secondary School, Vác)

When comparing the temperatures measured at the end of the autumn and during the winter with the mean temperature of the foregoing 50 years (Fig. 4), the winter 1958—59 must be qualified as mild, since the average of every month was higher than the corresponding averages of the preceding 50 years. The excess values varied between 0.5 and 2° C. Only the month of February 1959 was an exception, when the average temperature was 0.6° C lower than the 50-year average (Table 2).

Table 2

Month	Mean value of monthly temperature		Deviation of 1958—59 monthly mean values from mean value of 50 years
	1958—59	Mean value of 50 years	
October .....	11.1	10.6	0.5
November.....	6.2	4.7	1.5
December .....	3.0	0.9	2.1
January .....	-0.5	-1.5	1.0
February .....	-0.3	0.3	-0.6
March .....	7.7	5.6	2.1

A comparative scrutiny of the figures in Table 2 promotes a better appreciation of the experimental results.

Examining the daily minima (Fig. 5) we find that, until the collection of the first test series (November 19, 1958), temperature moved around the freezing point during 6 days only, while the weather was rather mild during the other days, not even the night temperatures falling below +5 to +10° C. This means that shoots of the first series had not been exposed to low temperatures. During the winter period it was only in the first third of December and between the first third of January and the first third of February that the plants came to be exposed to appreciable cold, the lowest value of which did not exceed -12° C (Fig. 5).

The effect of precipitation during the winter period could be demonstrated to a limited extent only. A number of our indigenous trees and shrubs, half-woody plants require snow cover for their hibernation. The buds of the dewberry (*Rubus caesius*), for instance, generally regarded as a hemicyclopedia, are not frostbitten in the snow-covered portions of the plant so that the height to which the buds can survive depends to a great extent on the thickness and duration of the annual snow cover. The development of buds during dormancy may further be delayed if rain gets frozen on to the buds, since the thin ice sheet so formed inhibits respiration.

#### Duration and rate of budding at different times of winter dormancy

Leaf-fall of the examined trees and shrubs terminated at the end of October in 1958. We collected the first samples on November 19. This date still belongs essentially to the autumnal period of "hardening". Temperature generally did not drop below the freezing point even at night so that the shoots to be tested had not been exposed to any appreciable cold effect. There exist certain species which can be induced to open their buds after defoliation at the end of the autumn period without previous exposure to cold, e. g.

*Sambucus nigra* on which 99.1 per cent of all leaf buds opened at + 20° C,  
*Frangula alnus* on which 81.1 per cent of all leaf buds opened at + 20° C,

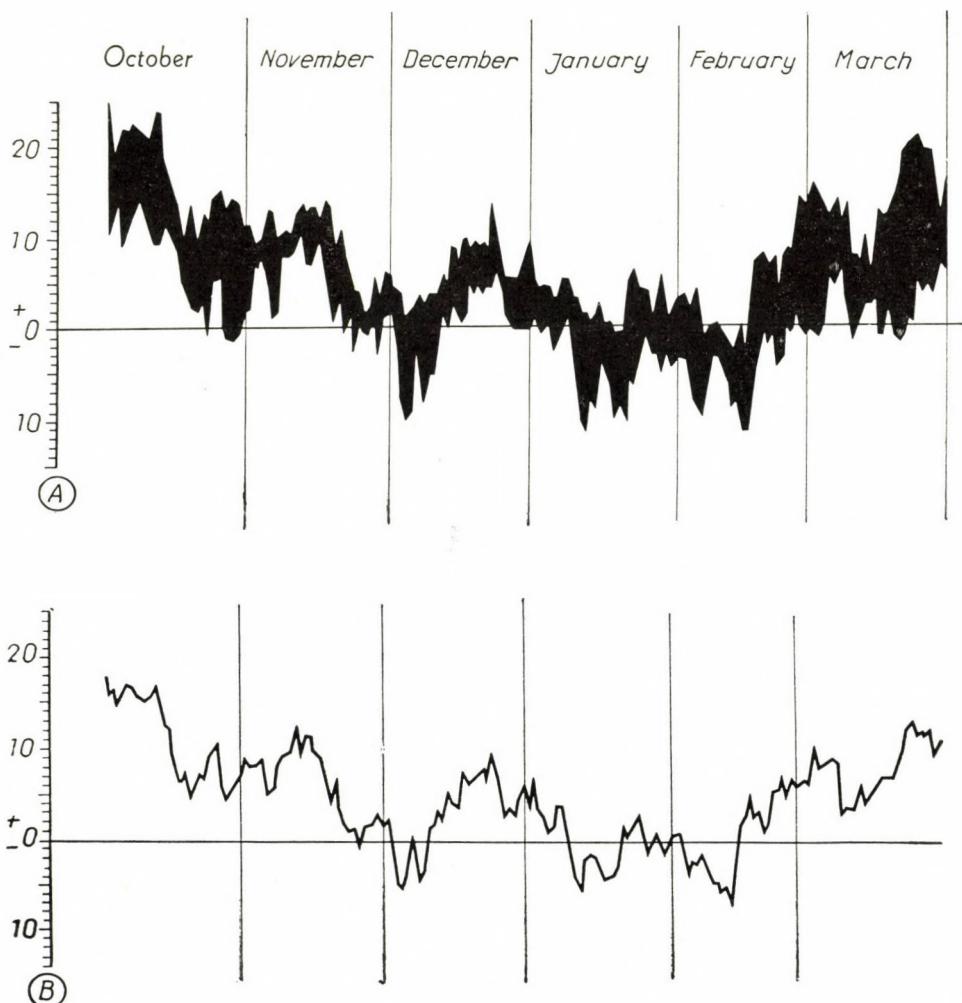


Fig. 5. A — Variation of temperature maxima and minima from October 1, 1958 to March 31, 1959. B — Variation of daily mean temperatures from October 1, 1958 to March 31, 1959

*Populus nigra* on which 58.4 per cent of all leaf buds opened at + 20° C,  
*Rubus caesius* on which 34.0 per cent of all leaf buds opened at + 20° C,  
*Cornus sanguinea* on which 21.6 per cent of all leaf buds opened at + 20° C.

Opening of the buds — true, at a very low rate — can be provoked immediately prior to the beginning of the winter rest period also in certain other species (e. g. *Rosa canina*, 6.1 p. c.; *Viburnum opulus* 3.6 p. c.; *Fraxinus angustifolia* 5.2 p. c.; *Quercus robur* 2.8 p. c.). It does not follow that these plants are capable of budding without chilling.

Again, there exist trees and shrubs which cannot be brought to open their buds at the beginning of the winter rest even by drastic heat treatment (+20 to 25° C). *Crataegus monogyna*, *Ulmus campestris*, *Alnus incana* and *Alnus glutinosa*, for instance, did not respond to a temperature of +20° C: they need an exposure to temperatures around or below freezing point during several weeks before they respond to heat treatment with budding. The situation was somewhat different after the second sampling (December 10, 1958): most of the last-named plants could be caused to sprout, although to a very insignificant extent only (*Crataegus monogyna* 1.1 p. c.; *Ulmus campestris* 8.2 p. c.; *Alnus incana* 9.5 p. c.), while not even one and a half month or two months of temperature at or below the freezing point were enough to induce *Alnus glutinosa* to sprout. Establishing further test series at intervals of about 20 days (Table 3) enabled us to ascertain the chilling requirement of the examined species; i. e. the duration of cold necessary for the beginning of vigorous budding.

The number of days indicated in Table 3 shows the time which has to elapse since leaf-fall in order to be able to induce budding by a compara-

Table 3

Beginning of experiment	Number of days since defoliation	Denomination of budding species	Percentage of budding
Nov. 19, 1958.	20	<i>Sambucus nigra</i> .....	99.1
	20	<i>Frangula alnus</i> .....	68.1
	20	<i>Populus nigra</i> .....	58.4
	20	<i>Rubus caesius</i> .....	34.0
	20	<i>Cornus sanguinea</i> .....	21.6
Dec. 10, 1958.	40	<i>Populus canadensis</i> v. <i>marilandica</i> .....	35.8
	40	<i>Populus alba</i> .....	22.5
	40	<i>Fraxinus angustifolia</i> .....	18.4
	40	<i>Viburnum opulus</i> .....	17.0
	40	<i>Salix alba</i> .....	15.6
Dec. 30, 1958.	60	<i>Alnus incana</i> .....	24.4
	60	<i>Salix purpurea</i> .....	21.6
	60	<i>Populus canescens</i> .....	18.2
Jan. 14, 1959.	75	<i>Rosa canina</i> .....	20.0
	75	<i>Quercus robur</i> .....	15.4
	75	<i>Ulmus campestris</i> .....	14.7
Febr. 3, 1959.	95	<i>Crataegus monogyna</i> .....	22.6
March. 3, 1959.	123	<i>Salix triandra</i> .....	42.1

tively strong heat effect (+20° C). This time is not necessarily enough to terminate the winter dormancy of all species contained in the Table as proved by the fact that only a certain percentage of all buds could be induced to open. The period of cold needed for a definite termination of winter dormancy is, as a rule, one to several weeks longer than that indicated in the table.

Table 4

*Duration and rate (percentage) of budding at +20° C in darkness and in natural light  
(Beginning of experiment, March 3, 1959)*

No.	Species	In darkness				In natural light			
		Budding				Budding			
		Onset*	Termina- tion*	Duration	Per cent	Onset*	Termina- tion*	Duration	Per cent
1.	<i>Crataegus monogyna</i> .....	8	15	8	87.9	7	11	5	88.8
2.	<i>Rubus caeius</i> .....	3	9	7	80.3	4	8	5	74.1
3.	<i>Rosa canina</i> .....	3	19	17	69.3	3	15	13	62.7
4.	<i>Frangula alnus</i> .....	10	32	23	55.8	14	19	6	31.8
5.	<i>Cornus sanguinea</i> .....	7	17	11	67.2	7	21	15	40.0
6.	<i>Sambucus nigra</i> .....	—	—	—	—	—	—	—	—
7.	<i>Viburnum opulus</i> .....	4	31	28	84.9	5	21	17	44.9
8.	<i>Fraxinus oxyacarpa</i> .....	14	37	24	15.7	14	32	19	21.3
9.	<i>Ulmus campestris</i> .....	11	15	5	27.1	14	17	4	46.8
10.	<i>Alnus incana</i> .....	7	14	8	68.7	5	14	10	62.9
11.	<i>Alnus glutinosa</i> .....	14	17	4	2.8	9	17	9	18.0
12.	<i>Quercus robur</i> .....	19	36	18	18.7	15	30	16	23.4
13.	<i>Populus alba</i> .....	9	32	24	25.0	8	32	25	32.7
14.	<i>Populus canescens</i> .....	9	31	23	30.5	9	29	21	38.7
15.	<i>Populus nigra</i> .....	9	39	31	51.7	8	27	14	46.0
16.	<i>Populus canadensis</i> var. <i>marilandica</i> .....	14	39	26	52.5	11	19	9	59.0
17.	<i>Salix alba</i> .....	5	19	15	52.6	4	14	11	50.4
18.	<i>Salix triandra</i> .....	1	17	17	42.1	3	22	20	50.0
19.	<i>Salix purpurea</i> .....	1	10	10	51.8	1	22	22	67.2

\* Number of days since the beginning of the experiment

The time at which budding was initiated was likewise different in the consecutive phases of winter dormancy. It is only natural that heat treatment had to be considerably longer at the beginning than in the later course of winter dormancy to obtain the same response. *Sambucus nigra*, for example,

Table 5

Duration and rate (percentage) of budding in experiments started at different times

No.	Species	Beginning of experiment																			
		Nov. 19, 1958				July, 10, 1958				July, 30, 1958				Jan. 14, 1959				Febr. 3, 1959			
		Budding		Budding		Budding		Budding		Budding		Budding		Budding		Budding		Budding			
		Onset*	Termination*	Duration	Per cent	Onset*	Termination*	Duration	Per cent	Onset*	Termination*	Duration	Per cent	Onset*	Termination*	Duration	Per cent	Onset*	Termination*	Duration	Per cent
1.	<i>Crataegus monogyna</i>	—	—	—	—	35	35	1	1.1	18	24	7	4.1	14	32	19	9.7	13	22	10	22.8
2.	<i>Rubus caesius</i> .....	13	19	7	34.0	8	8	1	43.9	6	10	5	6.0	4	15	12	79.0	6	16	11	84.7
3.	<i>Rosa canina</i> .....	17	34	18	6.1	14	18	5	2.6	9	16	8	5.2	4	13	10	20.0	6	10	5	17.7
4.	<i>Frangula alnus</i> .....	33	49	17	68.1	34	39	6	67.0	31	34	4	46.2	22	31	10	45.5	24	34	11	29.1
5.	<i>Cornus sanguinea</i> ...	38	61	24	21.6	27	40	14	27.4	18	23	6	24.9	18	22	5	48.3	13	21	9	56.9
6.	<i>Sambucus nigra</i> ....	13	26	14	99.1	5	32	28	63.9	1	13	13	64.2	—	—	—	—	—	—	—	—
7.	<i>Viburnum opulus</i> ...	34	49	16	3.6	22	39	18	17.0	13	20	8	8.6	21	43	23	18.5	10	22	13	27.3
8.	<i>Fraxinus oxyacarpa</i> ..	34	51	18	5.2	20	70	51	18.4	17	52	36	12.0	22	46	25	12.6	18	35	18	14.2
9.	<i>Ulmus campestris</i> ...	—	—	—	—	23	43	21	8.2	20	34	15	8.2	20	27	8	14.7	16	34	19	16.2
10.	<i>Alnus incana</i> .....	—	—	—	—	36	71	36	9.5	20	36	17	24.4	20	34	15	21.8	18	32	15	56.1
11.	<i>Alnus glutinosa</i> ....	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38	55	17	7.7	25	36	11	3.0
12.	<i>Quercus robur</i> .....	42	44	3	2.8	37	40	4	6.4	29	43	15	11.0	29	42	14	15.4	25	38	14	16.1
13.	<i>Populus alba</i> .....	32	42	11	10.9	23	42	21	22.5	24	36	13	8.0	22	39	18	15.3	17	34	18	14.0
14.	<i>Populus canescens</i> ..	38	42	25	1.5	20	32	13	9.0	13	43	12	18.2	22	39	18	13.9	17	25	9	16.9
15.	<i>Populus nigra</i> .....	24	50	27	58.4	16	36	21	77.8	23	45	23	42.4	15	49	35	65.4	16	38	23	64.6
16.	<i>Populus canadensis</i> var. <i>marilandica</i> ..	38	55	18	7.3	29	70	42	35.8	13	43	31	31.5	30	38	9	21.8	13	31	19	29.6
17.	<i>Salix alba</i> .....	14	38	25	7.1	14	27	13	15.6	9	20	12	11.8	14	29	16	22.9	11	32	22	18.1
18.	<i>Salix triandra</i> .....	20	49	30	9.3	20	39	20	11.3	13	27	15	13.2	14	31	18	13.8	11	32	22	13.2
19.	<i>Salix purpurea</i> .....	20	43	24	3.9	16	34	18	12.2	10	23	14	21.6	10	31	22	18.7	10	27	17	30.0

\* Number of days since the beginning of the experiment

although 99 per cent of its shoots cut off at the beginning of the cold period (Nov. 19) could be brought to budding at the time, required a heat treatment (at +20° C) of 13 days for the opening of the buds. The next samples, collected at intervals of 20 days, needed correspondingly shorter heat treatments (e. g. 5 days in the first and only a single day in the second instance, i. e. after 40 days). This rule applies to all examined species: the more advanced the rest period, the shorter the heat treatment required by the "ripe" buds to sprout (Table 5).

Our studies in 1956—57 had chiefly methodological purposes, and it was from the trees of the botanical garden of this Institute that the test samples were taken. Since some of the trees occur also in the neighbouring woods, it was possible to collect comparable data. We kept the samples at temperatures of 5 to 25° C (at five levels with 5° C intervals) and observed their heat requirement at a given time. It was found that, though grown in the same habitat, different species needed different optimum temperatures for the breaking of dormancy. Originally, we expected the most favourable results from the highest temperatures (20 and 25° C). (The idea arose that temperatures alternating within certain limits might assure more favourable results of growth: future experiments will have to test the soundness of this notion.) The following figures present those temperatures at which the examined plants showed the highest percentage of budding (for further details see Table 6). In all tests the shoots of different species were exposed to constant heat effects.

		%
at + 10° C	<i>Crataegus monogyna</i> .....	58.1
	<i>Rosa canina</i> .....	22.7
	<i>Alnus incana</i> .....	55.1
	<i>Populus alba</i> .....	18.2
	<i>Populus canescens</i> .....	33.3
	<i>Rubus caesius</i> .....	92.5
at + 15° C	<i>Frangula alnus</i> .....	56.5
	<i>Viburnum opulus</i> .....	43.9
	<i>Fraxinus angustifolia</i> .....	21.1
	<i>Ulmus campestris</i> .....	17.1
	<i>Salix purpurea</i> .....	24.0
	<i>Cornus sanguinea</i> .....	48.3
at + 20° C	<i>Quercus robur</i> .....	15.4
	<i>Populus nigra</i> .....	65.4
	<i>Alnus glutinosa</i> .....	16.2
at + 25° C	<i>Populus canadensis</i> var. <i>mari-</i>	
	<i>landica</i> .....	29.8
	<i>Salix alba</i> .....	34.8
	<i>Salix triandra</i> .....	17.5

Temperatures of 10 to 15° C seem to be favourable to induce growth in most of the examined species: 58 per cent of the species examined reached the highest percentage of budding at this level. Closely related genera, and species of the same genus often display a similar behaviour: for example, it was at 25° C that *Populus canadensis* var. *mariolandica*, *Salix alba* and *S. triandra*

reached the highest rate of budding. Worthy of note is the fact that *Alnus glutinosa*, which has the longest rest period, needed likewise a temperature of 25° C for the most vigorous budding. It seems that trees and shrubs the foliation of which is late under natural conditions, need higher and those with shorter rest periods lower temperatures for attaining the optimum rate of budding. Further experiments are necessary to see clearly in this respect.

### Role of light in the breaking of dormancy

Although the principal object of our experiments was to ascertain the effect of temperature on the test material, we established a series of experi-

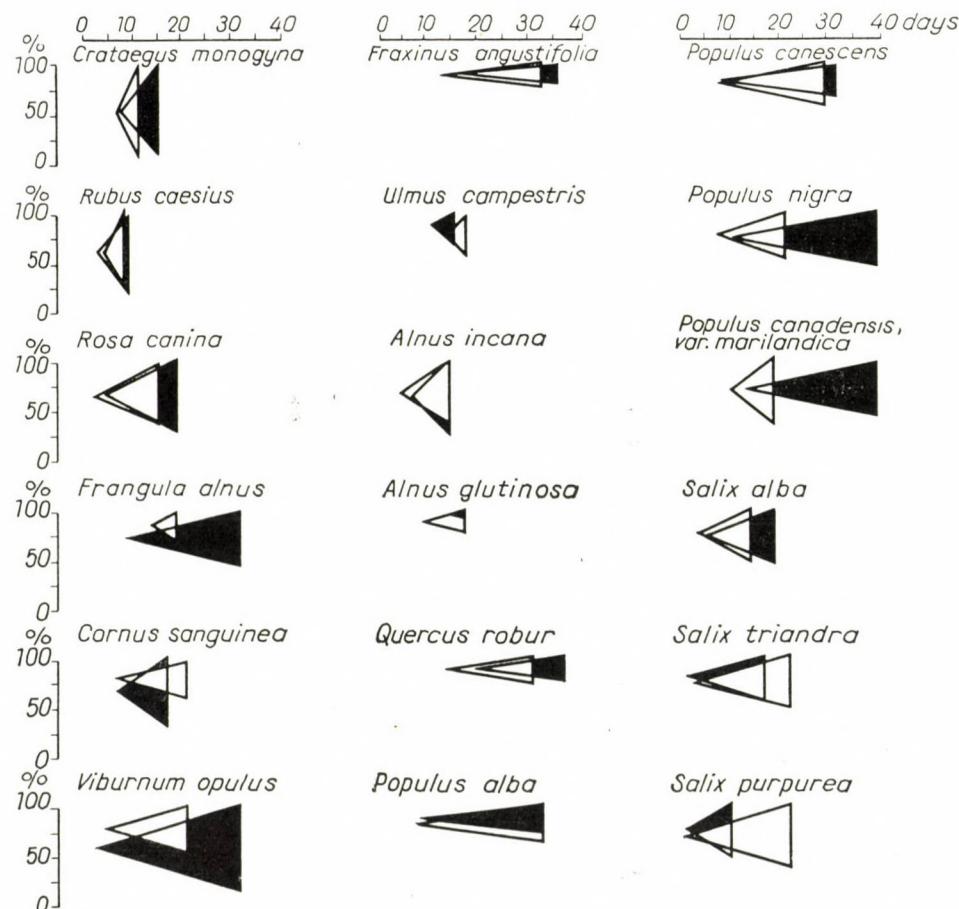


Fig. 6. Duration and rate (percentage) of budding in natural light and in darkness. Trial started on March 3, 1959. Number of days between beginning and termination of budding indicated on the abscissa, percentage of growth on the ordinate. Dark triangles mean growth in darkness, light triangles growth in natura light

ments on March 3, 1959, in which part of the collected shoots was kept in the dark at 20° C and another part in daylight at the same temperature. As regards budding, no essential difference between the two categories could be observed as can be seen in Table 4 and Fig. 6. Only a few trees and shrubs showed a conspicuously different behaviour. To be able to obtain conclusive results in this connection, repeated experiments on a larger scale are necessary. In some species shoots kept in the dark produced higher rates of budding: *Frangula alnus* 55.8 p. c. (dark), 31.8 p. c. (light); *Cornus sanguinea* 67.2 p. c. (dark), 40.0 p. c. (light); *Viburnum opulus* 84.9 p. c. (dark), 44.9 p. c. (light). Other heat-treated species showed percentages the other way round: *Ulmus campestris* 46.8 p. c. (light), 27.1 p. c. (dark); *Alnus glutinosa* 18.2 p. c. (light), 2.8 p. c. (dark); *Populus alba* 32.7 p. c. (light), 25.0 p. c. (dark).

The duration of the process of budding is, as a rule, considerably shorter in sunlight than in darkness. Exceptions among the examined 19 species were in this respect *Salix triandra* and *S. purpurea* which finished their budding 2 to 3 days earlier in the dark than in daylight. Budding in the case of *Frangula alnus*, *Populus nigra*, *P. canadiensis* var. *marilandica* was quicker in daylight by some 15 to 20 days. These data show that the effect of natural illumination differs from species to species in trend and degree. Conclusive evidence in this respect cannot be obtained without numerous further experiments in which it is intended to eliminate variations of the natural light, caused by changing weather, through the use of artificial light of planned intensity and period.

### Behaviour of the examined plants during winter dormancy

Relying on the evidence of our experiments, it is possible to divide the examined trees and shrubs into two principal categories corresponding to the division made by SAMISH [40] and referred to in the introductory part of this paper.

#### 1. Plants hibernating in a state of total or partial quiescence

*Alder Buckthorn* (*Frangula alnus* MILL.) is a shrub hibernating in a state of forced quiescence. Its vegetative buds are capable of sprouting without chilling at the termination of the autumn period of "hardening". In the first group of samples collected after leaf-fall (Nov. 19, 1958), 68.1 per cent of all buds opened. Let us note that the percentage was much lower after heat-treatment in the middle of the cold period. On the 20th and 40th day after leaf-fall growth was initiated in only 67 to 68 per cent, on the 60th, 70th and 95th day only 30 to 45 per cent of the buds. Shoots of *Frangula alnus* collected

**Table 6**  
*Duration and rate (percentage) of budding at different temperatures*

No.	Species	+ 5 °				+ 10 °				+ 15 °				+ 20 °				+ 25 °			
		Budding				Budding				Budding				Budding				Budding			
		Onset*	Termination*	Duration	Per cent	Onset*	Termination*	Duration	Per cent	Onset*	Termination*	Duration	Per cent	Onset*	Termination*	Duration	Per cent	Onset*	Termination*	Duration	Per cent
1.	<i>Crataegus monogyna</i> ..	42	42	1	1.3	28	54	27	58.1	15	42	28	35.5	14	32	19	9.7	9	28	20	9.7
2.	<i>Rubus caesius</i> .....	18	28	11	61.6	18	35	18	74.3	5	14	10	92.5	4	15	12	79.0	5	7	3	75.2
3.	<i>Rosa canina</i> .....	25	47	23	6.3	26	40	7	22.7	7	33	26	21.3	4	13	10	20.0	5	14	10	10.0
4.	<i>Frangula alnus</i> .....	—	—	—	—	61	81	21	36.5	34	43	10	56.5	22	31	10	49.5	16	17	2	31.7
5.	<i>Cornus sanguinea</i> ....	—	—	—	—	37	46	10	22.4	20	29	10	38.0	18	22	5	48.3	10	21	11	15.3
6.	<i>Sambucus nigra</i> .....	100 per cent budding at the beginning of the experiments																			
7.	<i>Viburnum opulus</i> ....	—	—	—	—	37	67	31	38.4	27	42	16	43.9	21	43	23	18.5	14	21	8	11.7
8.	<i>Fraxinus oxycarpa</i> ....	—	—	—	—	50	78	29	14.5	33	58	16	21.1	22	46	25	12.6	14	29	16	21.3
9.	<i>Ulmus campestris</i> ....	—	—	—	—	50	81	32	11.4	30	58	29	17.1	20	27	8	14.7	10	19	10	7.1
10.	<i>Alnus incana</i> .....	37	37	1	2.6	40	65	26	55.1	34	56	23	43.0	20	34	15	21.8	16	21	6	4.4
11.	<i>Alnus glutinosa</i> .....	—	—	—	—	—	—	—	—	47	56	10	4.0	38	55	17	7.7	28	36	9	16.2
12.	<i>Quercus robur</i> .....	—	—	—	—	—	—	—	—	49	64	16	12.3	29	42	14	15.4	20	29	10	3.3
13.	<i>Populus alba</i> .....	—	—	—	—	50	78	29	18.2	33	61	29	14.4	22	39	18	15.3	15	21	7	12.5
14.	<i>Populus canescens</i> ...	—	—	—	—	48	81	34	33.3	33	58	25	20.0	22	39	18	13.9	12	24	13	32.6
15.	<i>Populus nigra</i> .....	40	40	1	0.5	40	72	33	52.6	16	44	29	46.6	15	49	35	65.4	5	37	33	58.4
16.	<i>Populus canadensis</i> var. <i>marilandica</i> ..	—	—	—	—	51	70	20	22.0	38	45	8	16.7	30	38	9	21.8	20	40	21	29.8
17.	<i>Salix alba</i> .....	—	—	—	—	34	65	32	18.9	13	58	45	21.0	14	29	16	22.9	6	21	15	34.8
18.	<i>Salix triandra</i> .....	—	—	—	—	34	47	14	7.9	19	43	14	7.9	14	31	18	13.8	6	17	12	17.5
19.	<i>Salix purpurea</i> .....	40	46	7	2.7	28	51	24	37.6	12	39	18	24.0	10	31	22	18.7	6	20	15	19.8

\* Number of days since the beginning of the experiment

on the 120th day after leaf-fall showed a behaviour similar to that observed in shoots during the autumn period of "forced quiescence" (55.8 p. c. at + 20° C). This period (*i.e.* 120 days after leaf-fall) is one subsequent to the after-rest of winter dormancy, a second period of quiescence, which introduces the spring period of growth. The conspicuous mid-winter drop of budding percentage may be explained by the assumption that the plant passes through a quite short mid-rest phase the exact time of which is slightly different from specimen to specimen.

According to experimental evidence +15° C seems to be the most favourable temperature for inducing a vigorous budding of *Frangula alnus*. The double length of time is needed to induce this process at a temperature of +10° C. We failed to initiate budding at +5° C in those samples which were collected on January 14, 1959, with a view to ascertaining the temperature capable of breaking dormancy.

Strikingly different was the behaviour between shoots kept in the dark and those kept in natural light. Shoots kept in the dark needed four times as much time for the process of growth, while the rate of budding was nearly twice as high as that observed in shoots kept under natural illumination. However, additional observations are necessary for the drawing of definite conclusions.

*Black elder* (*Sambucus nigra* L.) is a shrub which hibernates in a state of total quiescence. It can be induced to bud during the whole winter period and a 100 per cent of buds open in the natural habitat during the mild autumn period of "hardening" and the winter dormancy. Shoots of the first series budded at a rate of 99.1 per cent about 20 to 30 days after leaf-fall (Nov. 19, 1958) at a temperature of +20° C. This was the exactly-definable period of quiescence. The percentage was lower in the case of shoots collected 40 and 60 days after leaf-fall (63 to 64 p. c.) but we were no more able to collect samples at the beginning of January since, by that time (75 days after leaf-fall), elder bushes had begun budding in nature.

*Lombardy poplar* (*Populus nigra* L.). Its properties are essentially different from those of the poplars indigenous to Hungary, *i.e.* *Populus alba* and *P. canescens*. *Lombardy poplar* has no marked period of deep rest. 20° C heat-treatment induced a 58.4 per cent budding immediately after leaf-fall. A 60 to 70 per cent budding can be induced at any time during the rest period, so that adequate heat is always capable of breaking the winter dormancy which has the character of a more or less forced quiescence. A temperature of 20 to 25° C seems to be most suitable for this purpose. We obtained, in the course of comparative investigations made in the middle of the rest period (January 14, 1959), only a 0.5 per cent budding at a temperature of +5° C and more than 50 per cent budding at temperatures above 10° C. This percentage rose to about 60% at temperatures between 20 and 25° C.

The process of budding lasted considerably longer in the dark than in daylight, while the rate of budding was higher in the first case in comparative tests set up towards the end of the rest period (Table 4).

*Dewberry* (*Rubus caesius* L.). Its buds are exceedingly sensitive to frost and those remaining above the snow cover get frostbitten during winter dormancy. This frost-sensitive plant is therefore regarded as belonging to the hemicryptophytes. Its behaviour in protected sites is similar to that of shrubs. Heat-treatment immediately after leaf-fall provokes budding without chilling and rest period. About 30 to 40 per cent of the buds may develop at the beginning of the rest period. Optimum budding, *i. e.* the termination of the rest period, takes about 70 days. Shoots collected at this time showed 79 per cent budding at a temperature of 20° C and the process started as soon as on the third or fourth day. Dewberry cannot be said to pass the winter in a state of totally-forced quiescence, for — as we have noted — only an insignificant part of the leaf buds can be brought to sprouting without chilling. Of all woody and half-woody plants growing in natural groves it is the dewberry which shows the most vigorous budding at low temperatures (around +5° C). It gives the best response at a temperature of 15° C. While the average percentage of budding at different temperatures (5, 10, 15, 20, 25° C) is 70 the rate was 92.5 per cent at 15° C. The rate of budding becomes suddenly rapid at this temperature. (It begins on the 18th day at 5 and 10° C, but on the 5th day at a temperature of 15° C.) Higher temperatures shorten the duration of budding (at 25° C for instance, 75.2 per cent of all buds began to develop within 3 days), while the percentage of budding is lower than at the optimal temperature of 15° C.

The effect of light did not seem to be of significance. The percentage of budding was essentially the same in shoots kept in light and in dark (Table 4). All the observed effect of light was a shortening of the process by a few days.

*Red dogwood* (*Cornus sanguinea* L.). It can be induced to budding as soon as in the autumn period of "hardening". In the samples collected on the 20th day following leaf-fall, 21.0 per cent of all buds began to sprout. Red dogwood has no definite period of deep rest since heat-treatment starts budding at any time during winter dormancy. From the time around the 75th day after leaf-fall about 50 per cent of all vegetative buds can be forced to sprout. (These observations were made on shoots kept in darkness.) The optimum temperature for the breaking of dormancy is about 20° C at which we obtained the highest rate of budding in the course of our comparative experiments. We failed to initiate this process at +5° C during the rest period, while the rate of budding became considerably lower at temperatures exceeding 20° C (*e.g.* 15.3 p. c. at 25° C).

It is likewise at 20° C that the duration of the process is the shortest. It took only 5 days at such temperature as from the 22nd day after sampling.

Shoots kept in the dark showed a higher rate of budding than those kept in daylight, while there was no essential difference between the two categories in respect of the duration of the process.

## 2. *Plants passing winter dormancy in a state of natural deep rest*

*Resinous alder* (*Alnus glutinosa* (L.) GÄRTN.). This plant displayed a behaviour during winter dormancy which differed from that of all other trees and shrubs collected from the flood area of the Danube. Although our experiments lasted four months, we failed to obtain even a 10 per cent budding in any of the samples collected in several consecutive series during this time. While the leaf buds of all other trees sampled in the second series (40 days after leaf-fall) could be forced to open (though the percentage was very low), it was impossible to obtain this in the case of *Alnus glutinosa* even on the 60th day. Experiments proved the resinous alder to be a tree hibernating for about 5 months in a state of very deep rest. Not even strong heat effects are able to break its dormancy to any significant extent. Its withdrawal during the first half of the rest period is so marked that no heat-treatment can force its leaf buds to start growing. Dormancy may be interrupted even in the later course only by higher temperatures: 10° C was insufficient to initiate budding, and the response was very insignificant even at temperatures of 15 and 20° C. Reaction was better at 25° C (16.2 per cent against 7.7 at 20° C). Higher temperatures than +25° C were not used in our experiments; probably 30 to 35° C is the heat which elicits the maximum response. We observed a significant difference between shoots kept in the dark and those kept in daylight. This may explain the source of error responsible for the fact that the percentage of budding was so markedly low in these trials. It was only 2.8 per cent in the case of shoots kept in the dark against 18.0 per cent for those kept in natural light. It is probable that higher figures could have been reached if we had continued our experiments under natural illumination during the whole winter period.

*Downy alder* (*Alnus incana* (L.) MÖNCH.). This plant has a rest period up to about 4 months. Heat-treatment during deep rest following leaf-fall does not provoke growth. The rate of budding was not higher than 8.0 per cent at a temperature of 20° C forty and even sixty days after defoliation. A higher percentage (30 and 60 p. c.) could be reached only on the 70th and 90th day. It was the 120th day after defoliation which seemed to be the termination of winter dormancy in 1958—59 with 70 per cent (and more) of the leaf buds having opened at this time.

This period was followed by one of forced quiescence lasting until the beginning of the favourable rise of temperature. Our investigations proved temperatures around 10° C to be most suitable for the budding requirements

of the downy alder. The highest rate of budding was obtained (on January 14, 1959) at this temperature (55.1 p. c.). Response was less ready to both higher and lower temperatures (e.g. 2.6 p. c. at 5° C and 4.4 p. c. at 25° C). Illumination did not seem to make any difference in respect of either duration or intensity of the process of budding (see Table 4).

*British oak* (*Quercus robur* L.) has a long period of deep winter rest. Heat induces but very feeble growth at any time during winter dormancy. About 2 to 3 per cent of the vegetative buds can be caused to sprout by a heat of +20° C during the days immediately after the autumnal leaf-fall, but not more than 15 to 20 per cent responded to heat-treatment even towards the termination of the period of deep rest. Temperatures between 15 and 20° C seem to be most suitable for the breaking of dormancy. Temperatures from 5 to 10° C elicited no response during the period of mid rest. At temperatures of 25° C and above, natural light did not affect either the duration or the intensity of growth.

*White poplar* (*Populus alba* L.). This is a tree with a long period of deep rest. Heat-treatment elicits but feeble reaction during the entire duration of winter dormancy. We found the length of the latter to be 140 to 150 days. This applies to the leaf buds, while the winter rest of the staminate and pistillate flowers is shorter. The intensity of budding remains unchanged during dormancy at temperatures from 10 to 25° C. Higher temperature may considerably shorten the process.

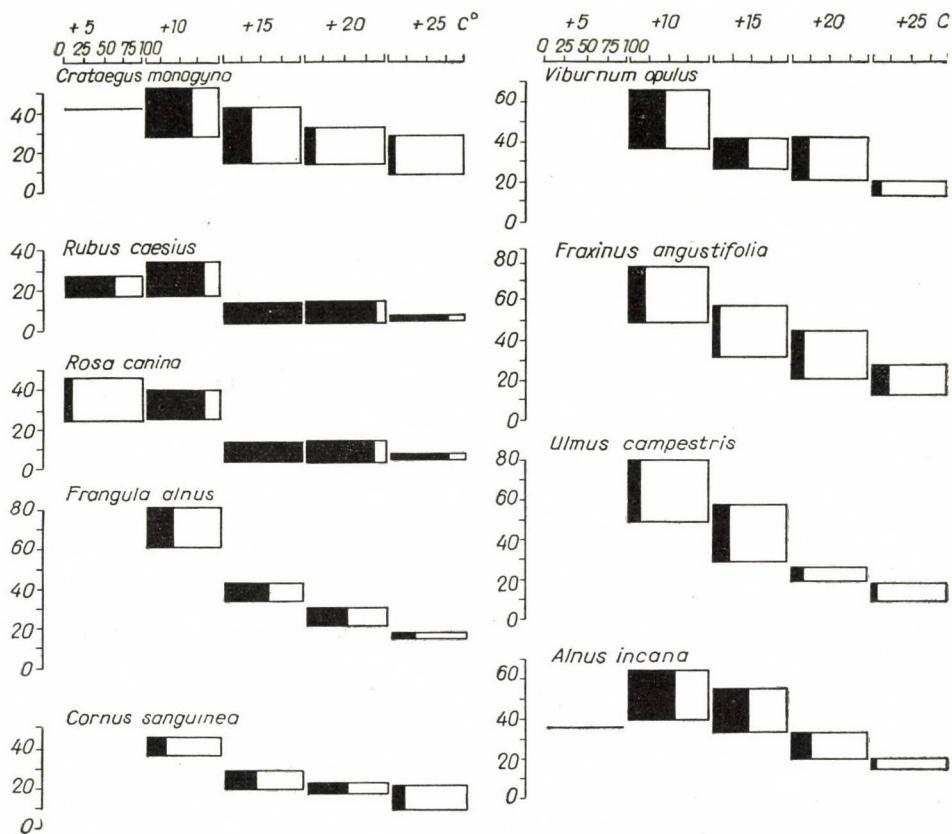
Intensity of budding was found to be higher on shoots kept in natural light: it was, towards the end of winter dormancy (March 3, 1959), at a temperature of 20° C, 25 per cent in the dark and 32.7 per cent in daylight. Duration, beginning and termination of the process of budding were identical in both cases.

*Grey poplar* (*Populus canescens* Sm.). Its behaviour during winter dormancy is essentially the same as that of the white poplar. This similarity is especially close in the second half of the rest period (Table 5 and Fig. 8). A temperature around 10° C is most suitable for the breaking of dormancy for both white and grey poplar.

The effect of natural illumination is the same as in the case of white poplar (Table 4).

*Canadian poplar* (*Populus canadensis* MÖNCH. var. *marilandica* REHDER). Though not indigenous, this tree is widely distributed in Hungary. Heat treatment elicits a slight response at any time during winter dormancy which lasts 130 to 150 days.

*White, purple and almond willow* (*Salix alba* L., *S. purpurea* L., *S. triandra* L.). The winter behaviour of these three species is closely similar. Leaf buds can be induced to sprout at any time during dormancy, though not more than 10—15 and exceptionally 20 per cent. The long winter rest of



a

the leaf buds lasts 130 to 150 days; from the 120th day 50 or more per cent of the leaf buds can be induced to sprout. A temperature exceeding 15°C seems to be best suited for the breaking of dormancy in all three species at issue. Even a temperature of 10°C suffices for the termination of dormancy in the case of the purple willow. That the last-named species requires less heat than the others is proved by the observation that the leaf buds of *Salix alba* and *S. triandra* do not respond to a temperature of +5°C, while *Salix purpurea* reacts with growth in 2.7 per cent of the buds.

While the percentage of budding is essentially equal in light-treated shoots and those kept in the dark as regards both *Salix alba* and *S. triandra*, the purple willow behaves differently also in this respect: the percentage was 51.8% for shoots kept in darkness and 67.2% for those kept in natural light. Values

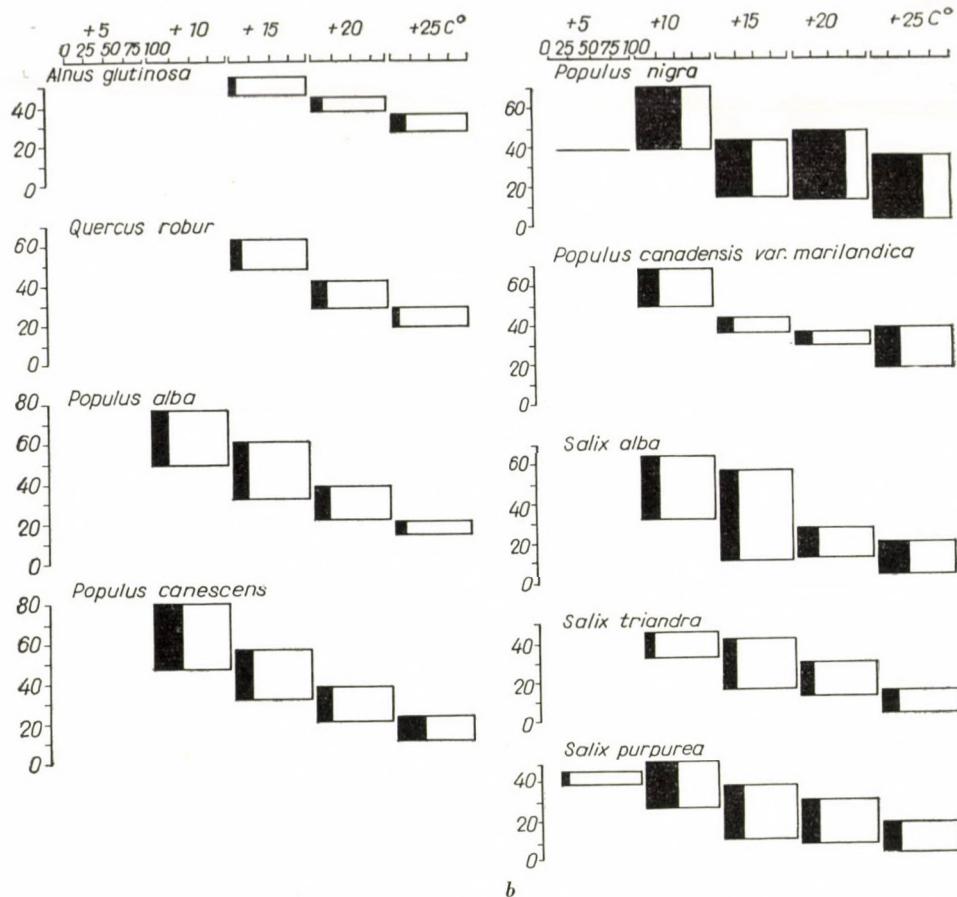
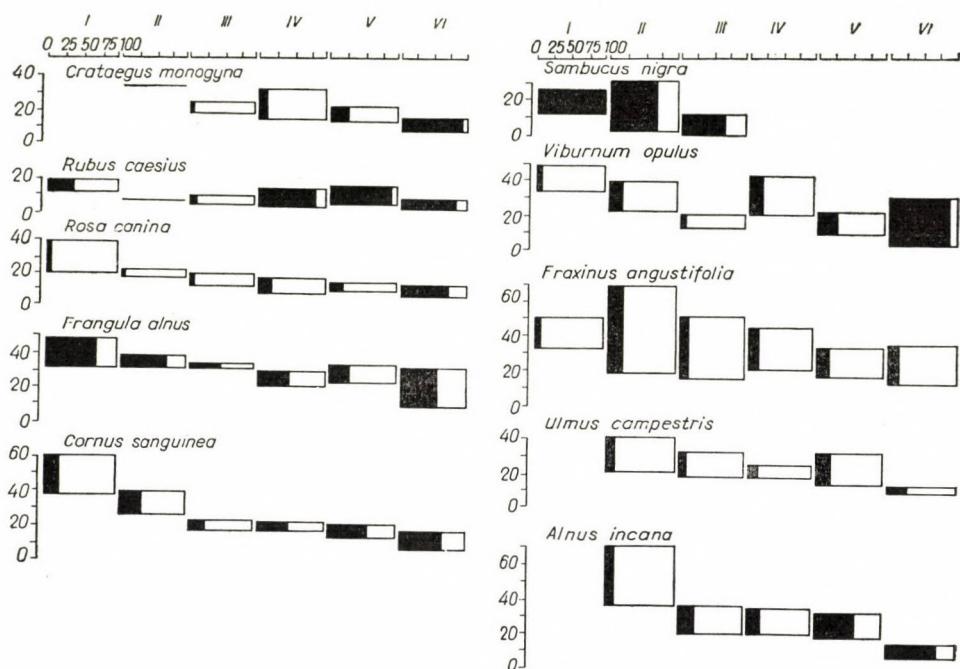


Fig. 7. a—b. Duration and rate (percentage) of budding at different temperatures. Trial started on January 14, 1959. Temperatures applied in the different experiments are indicated on the abscissa, duration of budding is indicated on the ordinate. Per cent of responding leaf buds shown by dark strip

regarding the duration of budding are the other way round: it took twice as much time in daylight as in darkness.

*Narrow-leaved ash* (*Fraxinus angustifolia* VAHL). Its winter dormancy lasts 140 to 150 days. The percentage of budding induced at 20° C was negligible during the whole rest period of 1959. It amounted to 5.2 per cent during the 20 to 30 days immediately following leaf-fall and to 18.4 per cent in the material collected on the 40th day, the latter percentage being the highest we obtained during the entire period of rest. Our experiments lasted 120 days during which five samplings were made, and the percentage of budding did not exceed 20% in any of the series. *Fraxinus angustifolia* must therefore be regarded as a tree undergoing a long and deep rest. A series of experiments, begun on January 14, i.e. in the second half of winter dormancy, had the ob-



a

ject to ascertain the temperature best suited for breaking the winter rest. Temperatures between 15 and 20° C seemed to be most suitable for this purpose at the given time, although the results we obtained were rather fluctuating (+5° C: 0.1%; +10° C: 14.5%; +15° C: 21.1%; +20° C: 12.6%; +25° C: 21.3%).

The intensity of growth proved to be higher (21.3 p. c.) in natural light than in the dark (15.7 p. c.). The duration of budding was 24 days in daylight against 19 days in darkness; it began on the 14th day in both cases.

*English elm (Ulmus campestris L.).* A typical representative of trees with a long rest period. Heat-treatment failed to elicit any response during the autumn period immediately following defoliation. Response was very slight during the winter period. The percentage of leaf buds responding to heat-treatment was not more than 27.1% even in the material collected on the 120th day. Winter dormancy lasts, according to our observations, at least 140 to 150 days.

A temperature of +15° C seemed to induce the highest rate of budding (17.1 p. c.) in the material collected on January 14, 1959. However, values

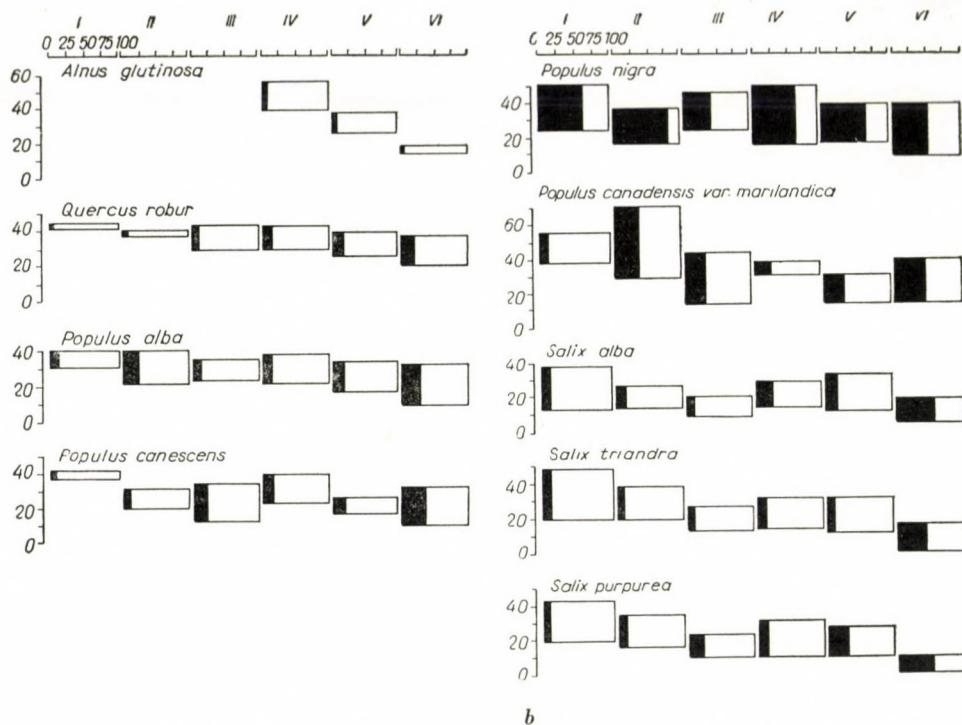


Fig. 3. a—b. Duration and rate (percentage) of budding in trials started at different times. Abscissa: per cent of responding leaf buds (I — Nov. 19, 1958; II — Dec. 10, 1958; III — Dec. 30, 1958; IV — Jan. 14, 1959; V — Feb. 3, 1959; VI — March 3, 1959). Ordinate: duration of budding. Dark strip: per cent of responding leaf buds in the various experiments

obtained at other temperatures were not very different (11.4 p. c. at 10° C and 14.7 p. c. at 20° C). Lower and higher temperatures seem to be still more unfavourable even for a partial interruption of the rest period since +5° C elicited no response, while the rate of budding was 7.1 per cent at 25° C.

The intensity of budding was twice as high in natural light as in darkness (at 20° C), so that the effect of light seems to be here a decisive factor in the breaking of dormancy (Table 4).

*Monogynous hawthorn* (*Crataegus monogyna* JACQ.). This is a shrub needing a rest period of 100 to 120 days. Even vigorous heat-treatment was incapable of breaking the rest of shoots kept in dark during the first month after defoliation. A temperature of 20° C elicited a response in 1.1 per cent of the leaf buds on the 40th and in 22.6 per cent on the 90th day of cold treatment. Winter dormancy terminates on the 100th to 120th day under natural conditions when a temperature between 10 and 20° C of 7 days' duration induces the process of budding. Optimum temperature for budding is about 10° C. Growth is approximately equal in the dark and in daylight (88.8 and

87.9 p. c., respectively). Nor did we observe essential difference between the two categories in respect of the time and duration of budding.

**Dog rose (*Rosa canina* L.).** About 2 to 6 per cent of the leaf buds can be induced to sprout by heat treatment as soon as at the end of the autumn period of "hardening". To obtain a higher percentage, a natural chilling below freezing point for 70 to 80 days was found to be necessary. After this, a treatment with heat of 20° C forced 17 to 20 per cent of the buds to open. The rest period of the leaf buds lasted 120 to 140 days in 1958—59, a length of time that may be regarded as typical. The rate of budding on shoots collected on the 120th day was 69.3 per cent. The rate obtained at +20° C in the preceding series, collected on the 95th day after leaf-fall was not more than 17.2 per cent. A temperature between 10 and 20° C seemed to be most suitable for breaking the dormancy of the dog rose. About 20 per cent budding was observed at such temperatures during the winter rest. Lower and higher temperatures proved to be less favourable: the rate of budding did not exceed 6 to 10 per cent in the series established on January 14. Growth started on the 25th day at a temperature of 5° C, on the 26th day at 10° C, but already on the 7th day at a temperature of 15° C.

Shoots of dog rose kept at 20° C behaved exactly alike whether they were in darkness or in natural light, in respect of both intensity and duration of budding (Table 4 and Fig. 6).

**Cranberry tree (*Viburnum opulus* L.).** Heat-treatment (20° C) elicited a response in 3.6 per cent of the leaf buds immediately after defoliation. Winter dormancy lasts 100 to 120 days. Heat-treatment (20° C) induced a response in 25 per cent of the buds during deep rest. Heat-treatment applied after 100 to 120 days definitely breaks winter dormancy, with a 85 to 80 per cent rate of budding. Thenceforth budding of heat-treated shoots can be initiated as soon as on the 4th day.

Temperatures from 10 to 15° C are most appropriate for breaking the dormancy of the cranberry tree: 40 to 43 per cent of the leaf buds respond to such temperatures during winter rest, while a temperature of +5° C elicits no reaction, 20° C elicits response from 18.5 and 25° C a response from 11.7 per cent of the leaf buds.

The rate of budding in the material collected on January 14, 1959 seemed, at a temperature of 20° C, to be twice as high in darkness as in natural light. This informative result, however, justifies no definite conclusions.

### Conclusion

Observations in the field and laboratory experiments, conducted for a period of three years, concerning the behaviour of 19 species of trees and shrubs during winter dormancy have enabled us to form a comprehensive picture.

Yet, a number of factors influencing the rest period need further elucidation. While publishing the above data, we emphasize the necessity of additional laboratory experiments. We propose the installation of microclimatic cabinets which will allow the precise control of temperature, light and humidity to enable us to obtain further data in substantiation of our findings. Meanwhile, phenological observations, made at frequent intervals during the whole year, will be continued.

#### LITERATURE

1. ALJOHIN, V. V. (1932) Die vegetationsanalytischen Methoden der Moskauer Steppenforscher, *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, 11 (6), 235—272.
2. Алексин, В. В. (1950) География растений. Москва.
3. Алексин, В. В. (1951) Растительность СССР. Москва.
4. ASKENASY, E. (1877) Ueber die jährliche Periode der Knospen. *Bot. Ztg.*, **35**, 795—848.
5. BALÁZS, F. (1950—1952) A virágos növények életforma-rendszere. The system in the way of life of floriferous plants. *Mosonmagyaróvári Mezőgazd. Kis. Int. Évk.*, **1**, 9—29. (In Hungarian)
6. Богданов, П. О. (1931) О фотопериодизме у древесных пород. *Тр. и исследов. по лесн. хоз. и лесн. промышл.*, **10**, 21—55.
7. Bos, H. (1907) Wirkung galvanischer Ströme auf Pflanzen in der Ruheperiode. *Biol. Cbl.*, **27**, 673—681, 705—716.
8. BRAUN-BLANQUET, J. (1951) Pflanzensoziologie. Zweite Auflage.
9. Булгакова, З. П. (1937) Влияние длины дня на распускание покоящихся почек у древесных растений. *Бот. журн.*, **22**, 413—419.
10. DENNY, F. E., STANTON, E. M. (1928) Chemical treatments for shortening the rest period of pot-grown woody plants. *Amer. J. Bot.*, **15**, 328—337.
11. DENNY, F. E., STANTON, E. N. (1928) Localization of response of woody tissues to chemical treatments that break the rest period. *Amer. J. Bot.*, **15**, 337—344.
12. DIELS, L. (1918) Das Verhältnis von Rhythmus und Verbreitung bei den Perennien des europäischen Sommerwaldes. *Ber. dtsch. bot. Ges.*, **36**, 337—351.
13. DOWNS, R. J. (1955) Photoreversibility of leaf and hypocotyl elongation of dark grown red kidney bean seedlings. *Plant Physiol.*, **3**, 468—473.
14. DOWNS, R. J., BORTHWICK, H. A. (1956) Effect of photoperiod on growth of trees. *Bot. Gaz.*, **117**, 310—326.
15. DOWNS, R. J., BORTHWICK, H. A. (1956) Effect of photoperiod upon the vegetative growth of *Weigela florida* var. *variegata*. *Proc. Amer. Soc. Horticultural Sci.*, **68**, 518—521.
16. DRUDE, O. (1932) Physiognomie, Temperatur und Klimacharakter. *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, 11 (6), 375—474.
17. GAMS, H. (1918) Prinzipienfragen der Vegetationsforschung. *Vierteljahrsschrift naturforsch. Ges. Zürich*, **63**, 293—493.
18. HOWARD, E. L. (1906) Untersuchung über die Winterruheperiode der Pflanzen. Halle.
19. IESENKO, F. (1911—1912) Einige neue Verfahren, die Ruheperiode der Holzgewächse abzukürzen. *Ber. bot. Ges.*, **29**, 273—284, **30**, 81—92.
20. JOST, L. (1893) Ueber Beziehungen zwischen der Blattentwicklung und der Gefäßbildung in den Pflanzen. *Bot. Ztg.* **51**, 89—134.
21. Катунский, В. М. (1940) О приспособительном значении фотопериодической реакции растений. *Сборн. научн. работ комсомольцев-биологов АН*. Москва—Ленинград. 5—15.
22. KÁRPÁTI, I., KÁRPÁTI, V. (1954) The aspects of the calciphilous turf (*Festucetum vaginatae danubiale*) in the environs of Vácrátót in 1952. *Acta Bot. Hung.*, **1**, 129—154.
23. KÁRPÁTI, I., KÁRPÁTI, V. (1953) A növénytársulások évi periodikus ritmusának vizsgálata. Untersuchungen über den periodischen Rhythmus der Pflanzenassoziationen. *Időjárás*, **57** (6), 1—12. (In Hungarian, German summary.)
24. KLEBS, G. (1917) Ueber das Verhältnis von Wachstum und Ruhe bei den Pflanzen. *Biol. Cbl.*, **37**, 373—415.
25. KRAMER, P. J. (1936) The effect of variation in length of day on the growth and dormancy of trees. *Plant Physiol.*, **11**, 127—137.

26. LAKON, B. (1912) Die Beeinflussung der Winterruhe der Holzgewächse durch die Nährsalze. *Ztschr. Bot.*, **4**, 561—582.
27. MÁNDY, Gy., KÁRPÁTI, I. (1958) Fafajok rügyfakadási hőigényének meghatározása. Die Bestimmung des Temperaturbedarfes von Baumarten zur Zeit des Ausschlagens. *Időjárás*, **62**, 261—266. (In Hungarian, German summary.)
28. MOLISCH, H. (1908—1909) Ueber ein einfaches Verfahren, Pflanzen zu treiben (Warmbadmethode). *Sitzb. Akad. Wiss. Wien, Abt. I.*, **117**, 87—117, **118**, 637—691.
29. MOLISCH, H. (1909) Das Warmbad als Mittel zum Treiben der Pflanzen. Jena.
30. MOLISCH, H. (1912) Ueber das Treiben von Pflanzen mittels Radium. *Sitzb. Akad. Wiss. Wien, Abt. I.*, **121**, 121—139.
31. MOLISCH, H. (1916) Ueber das Treiben ruhender Pflanzen mit Rauch. *Sitzb. Akad. Wiss. Wien, Abt. I.*, **125**, 141—162.
32. Мороз, Е. С. (1948) Экспериментально-экологические исследования периода покоя у древесных растений. *Эксп. Бот.*, **6**, 293—331.
33. MÜLLER-THURGAU, H. (1885) Beiträge zur Erklärung der Ruheperioden der Pflanzen. *Landw. Jahrb.*, **14**, 851—912.
34. OLMSTED, C. E. (1951) Experiments on photoperiodism, dormancy, and leaf age and abscission in sugar maple. *Bot. Gaz.*, **112**, 365—393.
35. PAULEY, S., PERRY, T. O. (1954) Ecotypic variations of the photoperiodic response in *Populus*. *Jour. Arnold Arbor.*, **35**, 167—188.
36. PFEFFER, W. (1875) Die periodischen Bewegungen der Blattorgane. Leipzig.
37. PFEFFER, W. (1904) Pflanzenphysiologie. 2. Aufl.
38. RÜBEL, E. (1925) Alpenmatten-Überwinterungsstadien. *Veröffentl. Geobot. Inst. Rübel in Zürich*, **3**, 37.
39. SALISBURY, E. J. (1925) The structure of Woodlands. *Veröffentl. Geobot. Inst. Rübel in Zürich*, **3**, 334.
40. SAMISH, R. M. (1954) Dormancy in woody Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **5**, 183—204.
41. SAUBERER, F., HÄRTEL, O. (1959) Pflanze und Strahlung. *Akademische Verlagsgesellschaft*, Leipzig.
42. SCHAFETTERER, R. (1922) Klimarhythmisik, Vegetationsrhythmisik und Formationsrhythmisik. *Österr. Bot. Z.*, **71**, 153—171.
43. SCHIMPER, A. E. (1898) Pflanzengeographie auf physiologischer Grundlage. Jena.
44. SHENNICKOV, A. P. (1932) Phenologische Spektren der Pflanzengesellschaften. *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*. **II**, (6), 251—266.
45. SIMON, S. V. (1914) Studien über die Periodizität der Lebensprozesse der in dauernd feuchten Tropengebieten heimischen Bäume. *Jahrb. Wiss. Bot.*, **54**, 71—187.
46. Soó, R. (1945) Növényföldrajz. Plant geography. Budapest. (In Hungarian.)
47. Soó, R. (1931) A magyar pusztas fejlődésének problémája. The problem of the development of the Hungarian plain. *Földr. Közl.*, **59**, (1—3), (In Hungarian).
48. Сукачев, В. И. (1950) Проблемы ботаники. Москва — Ленинград.
49. TOMASELLI, R. (1948) La pelouse à Aphyllantes (*Aphyllanthion*) de la garrigue Montpellieraine. *Stat. Int. Géobot. Médit. Alpine de Montpellier*, **99**, 1—139.
50. VAN DER VEEN, R., MEIJER, G. (1958) Licht und Pflanzen. *Philips Techn. Bibl.*
51. VAARTAJA, O. (1954) Photoperiodic ecotypes of trees. *Canad. Jour. Bot.*, **32**, 393—399.
52. WAREING, P. F. (1948) Photoperiodism in woody species. *Forestry*, **22**, 211—222.
53. WAREING, P. F. (1953) Photoperiodism in dormant buds of *Fagus sylvatica*. *Physiol. Plant.*, **6**, 692—706.
54. WEBER, F. (1911) Über die Abkürzung der Ruheperiode der Holzgewächse durch Verletzung der Knospen, beziehungsweise Injektion derselben mit Wasser (Verletzungsmethode). *Sitzb. Akad. Wiss. Wien, Abt. I.*, **12**, 179—194.
55. WEBER, F. (1916) Über das Treiben der Buche. *Ber. bot. Ges.*, **34**, 7—13.
56. WEBER, F. (1916) Studien über die Ruheperiode der Holzgewächse. *Sitzb. Akad. Wiss. Wien, Abt. I.*, **125**, 311—351.

## DIE WINTERLICHE RUHEPERIODE UNGARISCHER BAUM- UND STRAUCHARTEN

## I. Bäume und Sträucher der Auenwälder

Die Untersuchung der Ruheperiode von Baumarten der Auenwälder bildet einen Teil der seit 10 Jahren betriebenen synökologischen Forschungen. Die Kontrolle des in regelmäßigen, bestimmten Zeiträumen gesammelten Untersuchungsmaterials erfolgte im Laufe der unter Laboratöriumsbedingungen durchgeführten Untersuchungen mittels täglicher Zählung in auf verschiedene Temperaturen (+5, +10, +15, +20, +25, +30° C) eingestellten Thermostaten.

Im ersten Abschnitt der Versuchsreihe waren die Verfasser bemüht, auf die Rolle der Temperatur bei der Unterbrechung der Ruheperiode hinzuweisen. Gemäß den Untersuchungsergebnissen können die in Ungarn endemischen Baumarten der Auenwälder auf Grund der Merkmale ihrer Ruheperiode in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden:

1. In vollständigem oder teilweisem Zwangsruhezustand überwinternde Bäume und Sträucher. Diese befinden sich zur Zeit der winterlichen Ruheperiode in einem Zwangsruhezustand und können in einem beliebigen Zeitpunkt der Ruheperiode zu einem bedeutenden Prozentsatz zum Treiben gebracht werden. Zu dieser Gruppe gehören: *Frangula alnus* MILL., *Sambucus nigra* L., *Populus nigra* L., *Rubus caesius* L., *Cornus sanguinea* L.

2. Bäume und Sträucher mit natürlicher Tiefruhe. Diese Arten erfordern zur Zeit der winterlichen Kälteperiode einen mehr oder weniger großen Kälteeinfluß. In Abhängigkeit von der Art (ferner von Standortsbedingungen, sowie individuellen und Alterseigenschaften) benötigen sie eine Ruheperiode von charakteristischer Dauer und Intensität. Während dieser Periode können sie bei einer beliebigen Wärme- oder Lichteinwirkung nur in einem minimalen Prozentsatz zum Treiben genötigt werden. Hierher gehören: *Alnus glutinosa* (L.) GÄRTN., *Alnus incana* (L.) MÖNCH., *Quercus robur* L., *Populus alba* L., *Populus canescens* Sm., *Salix alba* L., *Salix purpurea* L., *Salix triandra*, *Fraxinus angustifolia* VAHL., *Ulmus campestris* L., *Crataegus monogyna* JACQ., *Rosa canina* L., *Viburnum opulus* L.

## ЗИМНИЙ ПЕРИОД ПОКОЯ ВЕНГЕРСКИХ ДРЕВЕСНЫХ И КУСТАРНИКОВЫХ ПОРОД

## I. Деревья и кустарники пойменных лесов

Изучение периода покоя древесных пород пойменных лесов представляет собой одну часть проводимых в течение 10 лет синэкологических исследований. Контроль собранного в систематических, определенных интервалах времени материала осуществлялся при лабораторных условиях ежедневными подсчетами в установленных на различные температуры (+5, +10, +20, +25, +30° C) термостатах.

В первой стадии опытной серии авторы старались указать на роль температуры в прерывании периода покоя. Согласно полученным результатам венгерские эндемические древесные породы пойменных лесов можно на основании признаков их периода покоя отнести на две главных группы:

1. Деревья и кустарники, перезимывающие в состоянии полного или частичного принудительного покоя. Во время зимнего периода покоя они находятся в принудительном покое, и их можно в любой момент периода покоя в значительном проценте привести к распусканью почек. Сюда относятся следующие породы: *Frangula alnus* MILL., *Sambucus nigra* L., *Populus nigra* L., *Rubus caesius* L., *Cornus sanguinea* L.

2. Деревья и кустарники с естественным глубоким покоем. Эти породы требуют во время зимнего холодного периода более или менее значительного влияния холода. В зависимости от породы (условий места произрастания, как и индивидуальных, и возрастных особенностей) им необходим период покоя с типичной продолжительностью и интенсивностью. В течение этого периода их почкования можно достигнуть при любом температурном или световом воздействии только в минимальном проценте. Сюда относятся: *Alnus glutinosa* (L.) GÄRTN., *Alnus incana* (L.) MÖNCH., *Quercus robur* L., *Populus alba* L., *Populus canescens* Sm., *Salix alba* L., *Salix purpurea* L., *Salix triandra* L., *Fraxinus angustifolia* VAHL., *Ulmus campestris* L., *Crataegus monogyna* JACQ., *Rosa canina* L., *Viburnum opulus* L.

VERA KÁRPÁTI, Vácrátót, Hungary.

ISTVÁN KÁRPÁTI, Vácrátót, Hungary.



# EFFECT OF TEMPERATURE ON THE REDOX POTENTIAL IN BACTERIAL CULTURES

S. ZADOR

WEST LONDON HOSPITAL MEDICAL SCHOOL, LONDON

(Received June 22, 1960)

## Summary

Investigations were carried out to see how microorganisms follow the laws of thermodynamics. The technique of redox potential measurement was used for the purpose. Results show that these laws are applicable only when H is replaced by the temperature characteristic  $\mu$ . Or putting it differently: microorganisms do not conform to the thermodynamic laws as physical systems do unless the particular formula is adapted for use with biological systems.

Since the organisms appear to have an optimal temperature range in which the fall in redox potential is maximal within a time-unit, the technique employed in this work could probably be used as an aid in classifying microorganisms.

*Bacillus coli* cultures were incubated at various temperature levels. Higher temperature means more heat. To be exposed to higher temperature means to be forced to take up energy in the form of heat, while lower temperature means loss in energy. These investigations intended to find out what the organisms do, how they react to the excess or to the loss of energy. Do they behave like physical systems or have they something characteristic of the biological systems?

## Methods

The method adopted was the recording of redox potentials developed in the liquid bacterial culture medium. For recording an electrical pH meter was used. The culture medium was McConkey's double broth. The medium was inoculated with 0.25 ml of a 40 hours old *Bacillus coli* culture. Ten tubes were used. Five tubes were inoculated and incubated at 11.1° C., 21.7° C., 30° C., 37° C., and 45° C. (these will be referred to as Experiments), while the other five were left sterile and kept at the same temperatures and served as blanks. (For the sake of simplicity 10° C and 20° C will be used instead of 11.1° C. and 21.7° C.) The results obtained were plotted on a graph in the co-ordinates system, mV potentials on the ordinate, time on the abscissa in Fig. 1, and mV potentials on the ordinate and temperatures in the abscissa in Fig. 2. The maximal changes and their times are shown in Table I. Readings higher than the starting-point are marked with “—” sign. The mode of interpretation of these results was discussed at length by the author elsewhere [6].

## Results

Fig. 1 and Table I demonstrate that at 10° C, no activities take place, the curve is very similar to the blank. A slow gradual fall after 32 hours is probably caused by the dying organisms. It is observable in all tubes at the

same time, but the blanks. While at 20° C — after 10 hours — the process is gradually developing, the most vigorous changes occur at 37° C and 45° C. Or else, the decrease in mV nearly reaches its maximum in the 37—45° C

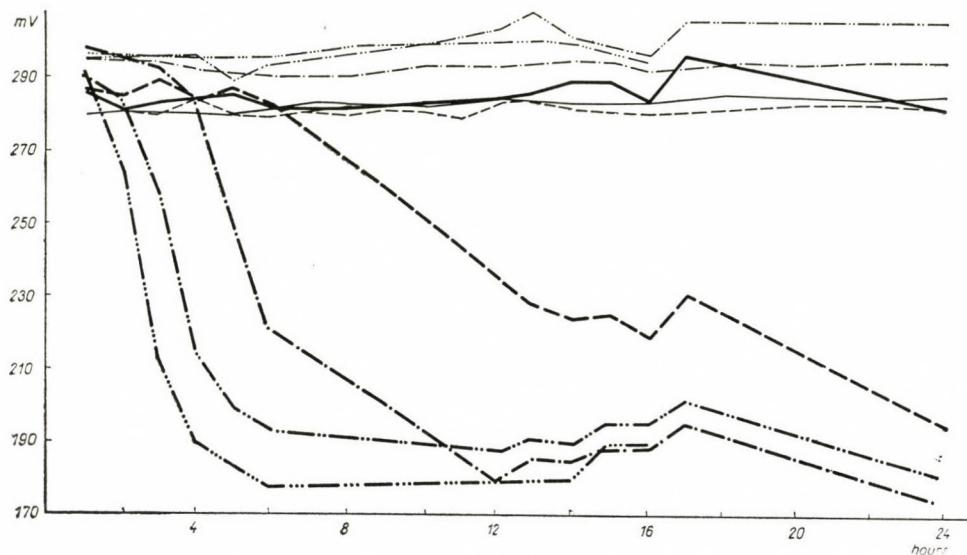


Fig. 1. Redox potential changes of *B. coli* cultures at various temperatures: 10° C (—), 20° C (---), 30° C (-·-·-), 37° C (-·-·-), 45° C (-·-·-). Thin curves represent the blanks

group when the other two groups are about to start. The maximum potential difference after a 10° C increase in temperature from 20 to 30° C is nearly doubled.

Table 1

Temperature in °C	mV maximal change		Time in hours	
	Experimentals	Blanks	Experimentals	Blanks
10	7	- 6	10	34
20	58	5	30	40
30	120	7	22	8
37	103	-13	22	24
45	114	-13	10	22

Fig. 2 gives the results of the redox potential changes against the various temperatures at various times: 0—4—8—12—16—20 hours after the experiment started. There is a steep in mV between 30 and 45° C after 4 hours, while practically nil between 10 and 30° C. This part of the curve goes nearly

parallel with the 0 hour line. After 8 hours activity starts already at 20° C, 12 hours depicts a picture identical with the 8 hours culture up till 20° C, then decreasing rapidly and follows the path of the 16 and 20 hours curves. There is little difference in the curves of this latter group. After 16 hours considerable potential changes take place even at 10° C.

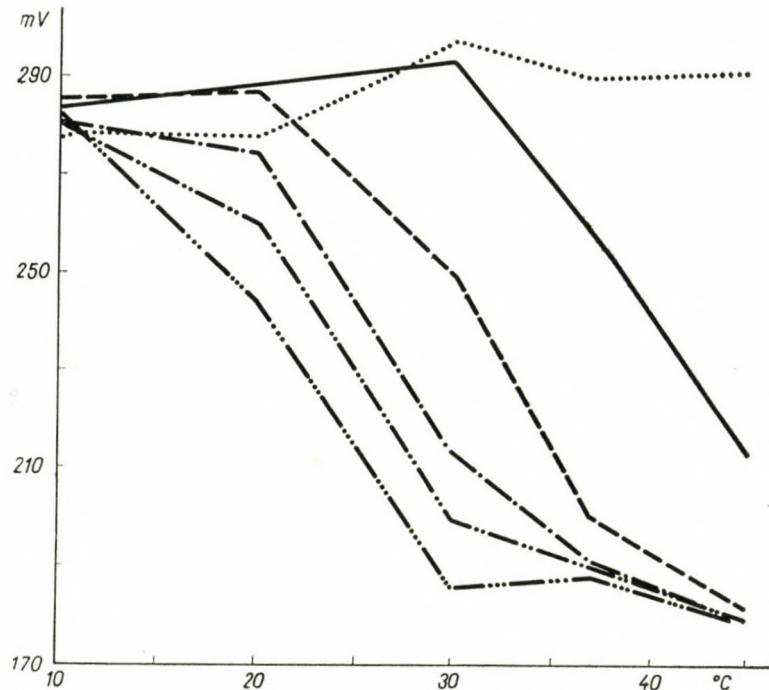


Fig. 2. Redox potential changes of *B. coli* cultures at various temperatures and at various times: 0 (.....), 4 (—), 8 (— - -), 12 (- · -), 16 (- · · -), 20 (- · · · -) hours

### Discussion

The majority of chemical reactions in physical (not biological) systems is increased in rate by increase in temperature. For a non-biological system a second order reaction would be:

$$\frac{d}{dt} \ln K = \frac{-H}{RT^2}$$

where  $R$  = gas constant

$T$  = absolute temperature

$K$  = velocity constant.

A glance at Fig. 1 will be enough to prove that this is not the case in biological systems. In these systems

$H$  is replaced by  $\mu = E$ .

$H$  = heat of reaction (cannot be applied to biological systems)

$\mu$  = temperature characteristic of Arrhenius constant.

It gives the "energy of activation", *i. e.* the amount of energy needed by a mole of the substrate to be brought into a "reacting state".

Biological systems in activity do not generally give a straight line when plotted, but a curve; with increase of temperature the value of  $\mu$  often falls [2] and since  $H$  in these systems has to be replaced by  $\mu$ , they do not and they cannot behave like physical systems; they live their own life, distinct from the physical systems and have their own characteristics.

The effect of temperature on growth was investigated among other organisms [4, 5] on *B. coli* [1]. The growth was plotted as "generation time" against temperature and it was found that

1. At 10° C, there is no growth at all;
2. At 20° C there is some growth present;
3. At 30° C the growth is approximately doubled for the 10° C increase from 20—30° C [1, 3];
4. Between 30—45° C the growth was the quickest, showing hardly any difference in the extent of growth [2].

The curves of the systems at various temperatures (Fig. 1) when compared with each other do not show any regularity in the velocity of the reactions, but are rather suggestive of "preferential grouping": they show preference towards certain temperatures, at which their growth, metabolic activities, appear to be optimum. The graph does not present straight lines, but curves with a maximum range in them. And this is significant because this maximum expresses the preference, the likes and dislikes of the system; these are characteristics of the living system as compared with the straight line of a physical system expressing an inanimated existence, a strict obedience to the physical laws of nature.

In Fig. 2 the mV potentials were plotted against the temperature. Here again a preferential temperature range is in existence. The explanations suggested for Fig. 1 hold valid for Fig. 2 as well.

Both graphs indicate that the "optimum range" is between 30—45° C, giving strikingly the same results as the ones obtained in BARKER's experiments [1]. Altogether, the results obtained by the redox potential technique are very similar to those found by the other workers using different techniques as summarized in the four points enumerated above. This also suggests close relationship between growth and redox potential.

The distribution of the curves of the graphs presented here is characteristic of organisms living at body temperature; human saprophytes and pathogens.

Soil bacteria and other types of microorganisms would show a different distribution according to their preferences. Therefore the method would be well worth trying for qualitative evaluation of microorganisms. The preference shown by the organisms is most probably determined by the enzymes present and by the characteristics of the certain organisms.

#### Acknowledgements

I wish to express my thanks and appreciation to Sheppard Electronics Limited, London W. 1., for their help and co-operation in making possible the carrying out of these studies. I also wish to express my gratitude to Mr. H. BLUNT, F. I. M. L. T., West London Hospital, Hammersmith, W. 6., for his assistance and advice in doing these experiments.

#### LITERATURE

1. BARKER, M. A. (1908) The rate of multiplication of *B. coli* at different temperatures. *J. Inf. Dis.*, **5**, 379—400.
2. CROZIER, J., HOAGLAND, H. (1934) The study of living organisms. Clark University Press, Worcester.
3. MONOD, T. (1942) Le croissance des cultures bactériennes. Herman & Co., Paris.
4. SLATOR, A. (1906) The rate of fermentation. I. *Trans. Chem. Soc.*, **89**, 128—142.
5. SLATOR, A. (1908) The rate of fermentation. II. *Trans. Chem. Soc.*, **93**, 217—242
6. ZADOR, S. (1958) The effect of sunlight and temperature on the redox potential growth of liquid media. *J. Clin. Path.*, **II**, 339—342.

#### DIE WIRKUNG DER TEMPERATUR AUF DAS REDOXPOTENTIAL IN BAKTERIENKULTUREN

Es wurde untersucht inwieweit die Mikroorganismen den Gesetzmäßigkeiten der Thermodynamik folgen. Die Untersuchung des Redoxpotentials sollte auf das obige Problem Antwort geben. Es stellte sich heraus, daß die Gesetze der Thermodynamik nur dann auf Mikroorganismenkulturen verwendet werden können, wenn das H durch die Temperaturcharakteristik  $\mu$  ersetzt wird. Mit anderen Worten: die Mikroorganismen folgen den thermodynamischen Gesetzen der physikalischen Systeme nur wenn eine spezielle, vom Gesichtspunkt der biologischen Systeme ausgearbeitete Formel verwendet wird.

Da die Organismen über ein optimales Temperaturintervall verfügen, in dem die Abnahme des Redoxpotentials innerhalb der Zeiteinheit maximal ist, kann die in der vorliegenden Mitteilung verwendete Technik in der Klassifizierung der Mikroorganismen offenbar behilflich sein.

#### ДЕЙСТВИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ

Проводились исследования для выяснения вопроса, каким образом микроорганизмы подлежат законам термодинамики. Для этой цели применялась техника измерения окислительно-восстановительного потенциала. Результаты показывают, что эти законы применимы только в том случае, если H заменяется характеристикой температуры  $\mu$ .

Другими словами: микроорганизмы в противоположность физическим системам не подлежат законам термодинамики, если специальная формула не адаптируется для применения к биологическим системам.

Ввиду того, что организмы повидимому обладают оптимальной величиной температуры, при которой уменьшение окислительно-восстановительного потенциала в пределах единицы времени бывает максимальным, вышеописанная техника предположительно применима в качестве вспомогательного метода при классификации микроорганизмов.

S. ZÁDOR, Bethnal Green Hospital, Cambridge Heath Rd., London,  
E. 2. England.

# THE CHANGES OF THE BOUND AMINO ACID COMPOSITION OF THE SHOOT APEX — DEVELOPING INTO MALE INFLORESCENCE — OF MAIZE, DURING DIFFERENTIATION

KLÁRA SZABÓ

DEPARTMENT OF PHYLOGENY AND GENETICS, EÖTVÖS LORÁND UNIVERSITY, BUDAPEST  
(HEAD: B. FALUDI)

(Received June 10, 1960)

## Summary

During the development of the male inflorescence of *Zea mays*, the components of bound amino acids are altering quantitatively. The changes of concentration of the respective amino acids are often antagonistic.

Proteins of the developing male inflorescence contain much less prolin, than those of the developed one and the pollen.

The glutamic acid concentration of protein is relatively high, while aspartic acid is totally absent, a fact which is worthy of note.

Apart from transitional alterations, there is no essential quantitative or qualitative change in the concentration of bound amino acids of the male inflorescence, while its weight increases thousandfold. The relatively high and increasing concentration of  $\alpha$ -alanine forms an exception.

## Introduction

Experiments have been carried out for a long time about the differentiation of shoot-meristemes; that is, the development of shoot apices into generative organs, these experiments having the purpose of elucidating the manner of photoperiodical reaction, the sexualization and the onto-phylogenetical connections.

The onto-phylogenetical morphogenesis is examined by the majority of authors by external-morphological and histological methods. The metabolism of protein, belonging to the manner of photoperiodical reaction and the physiology of sexualization was investigated in relatively few works [5, 21, 22]. Some authors examined the connection between male sterility and amino acid composition [7, 10].

In view of the fact, that the last mentioned works involved researches performed on totally different kinds of plants, and were restricted to the examination of free amino acids, it seemed justified to extend our experiments to objects important from the point of view of economics and to the analysis of bound amino acid.

We consider the investigations of physiological changes during the development of the male inflorescence of *Zea mays* as preparatory to the study of compatibility — incompatibility and male sterility.

### Material and method

The strain "Martonvásár C—5" of *Zea mays* was grown near Budapest at the Biological Station of Alsógöd in 1958, under natural photoperiodical conditions in the field. The shoot apices of the principal axis of maize plants were prepared with an ophthalmological scalpel. The shoot apex was separated. The first, second and third internodes from the top were left together, the fourth, fifth and sixth ones were cut. The weight of the several parts was measured separately in measuring bottles on an analytical balance. The material to be examined was divided into six groups according to the weight of the growing point or the male inflorescence, respectively (Table 1 and Fig. 1).

The shoot apex and internodes connected with it were stored after fixing in 96 p. c. ethanol. The material was homogenised with glass-powder in a mortar, then centrifuged and

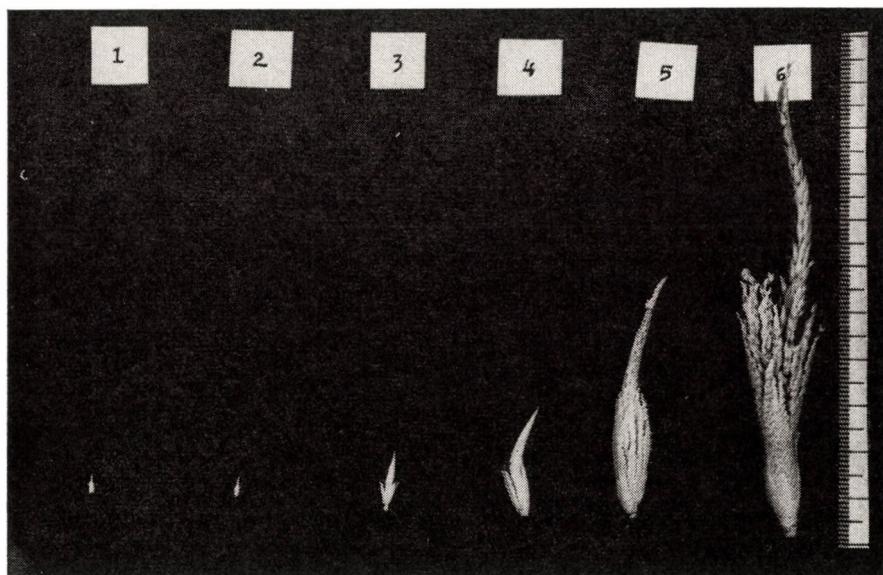


Fig. 1. Male inflorescence of maize, arranged weight classes 1 to 6

the bound amino acid was set free from the rest according to LEVY and CHUNG [19]. The method applied by us differed from the original in so far as we gave the  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  in form of powder to the examined matter: 0.5 gm. per combustion tube and  $\text{H}_2\text{O}$  too; furthermore, removing of Ba-ions was with a  $\text{CO}_2$  stream, forming  $\text{BaCO}_3$ . The hydrolysate was evaporated on water bath. The lipids contained in the evaporated matter were removed by washing with petrol-ether. The dry rest was dissolved in 50 p. c. ethanol, amino acid analysis was effected from a part corresponding to 20 mgm fresh matter. Acid hydrolysis could not be carried out because of shortage in material. Despite this, the trend of change in the concentration of serine and lysine is evident.

Bound amino acids were analysed by paperchromatography, on two-dimensional chromatograms, according to LEVY and CHUNG [19]. The quantitative determination of each amino acid was based on circular chromatograms, in accordance with the method of FISCHER and DÖRFEL [9]. In several experiments authentic samples of amino acids were also run in the ring chromatograms. The extinction values were referred to 20 mg of fresh material, after dissolving the cuprous complex in 5 ml of ethanol and carrying out the measuring with  $S_{53}$  filter in 1 cm cuvette. Extinction coefficients were expressed in  $\alpha$ -alanine, and these values are reported. The data correspond to samples originating from three parallel weighings. Each sample was run 2 to 6 times in a parallel arrangement, according to the available quantity.

## Results

The formation of the weight of the male inflorescence and of the nodes and internodes below it, during growth, gives information about the course of the outer differentiation of the primary axis.

The data of Table 1 clearly show the fact — important from the point of view of morphology — that the principal axis narrows markedly at the 4th internode from the top.

Errors are in many cases large enough. This was caused partly by the small number of individuals investigated (Table 1), partly by the fact that the

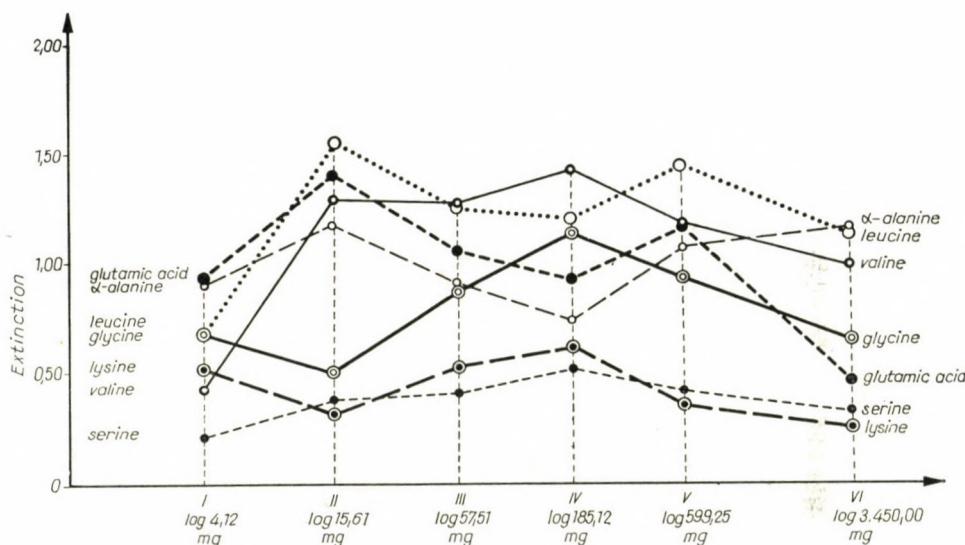
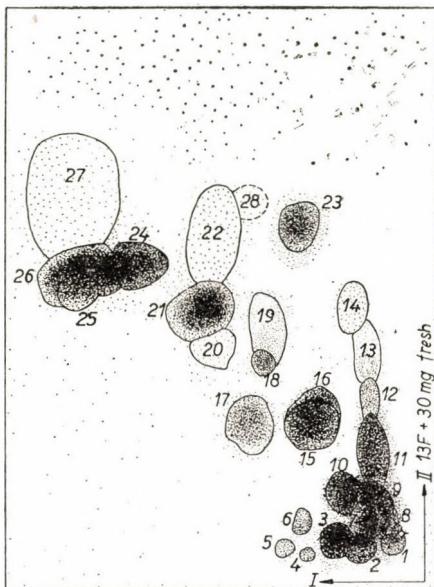


Fig. 2. The change of extinction of bound-amino acid of male inflorescence of maize, during development. Extinctions expressed as  $\alpha$ -alanine units. Ordinate : extinction through  $S_{53}$ . Abscisse : The average weight of the inflorescence in logarithmic scale in the various groups

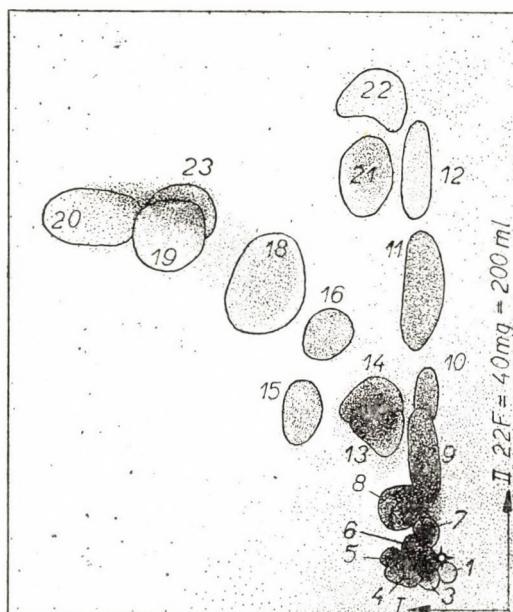
rapid differentiation of shoot apices resulted in a quick exhaustion of individuals belonging to the low weight class.

In the male inflorescence — belonging to weight classes 1 to 6 — of *Zea mays*, the following bound amino acids were proved by circular and two-dimensional chromatograms: cystine-cysteine, glutamic acid, serine, glycine, lysine, arginine, histidine,  $\alpha$ -alanine, tyrosine, valine, isoleucine, leucine, proline. The absence of aspartic acid is worthy of note.

From the amino acids demonstrated the quantitative changes of glutamic acid, serine, glycine, lysine,  $\alpha$ -alanine, valine and leucine, are compared on the basis of their extintive coefficient in the weight classes 1 to 6. These amino



*Fig. 3. Bound amino acids of 30 mg fresh matter from the first weight class. 1 — cystine-cysteine, 3 — glutamic acid, 9 — serine, 10 — glycine, 11 — lysine, 13 — arginine, 14 — histidine, 15, 16 —  $\alpha$ -alanine, 17 — tyrosine, 18 — valine, 22 — methionine?, 25, 26 — isoleucine-leucine*



*Fig. 4. Bound amino acids of 40 mg fresh matter from the second weight class. 1 — cystine-cysteine, 6 — glutamic acid, 7 — serine, 8 — glycine, 9 — lysine, 11 — arginine, 12 — histidine, 13, 14 —  $\alpha$ -alanine, 15 — tyrosine, 18 — valine, 19, 20 — isoleucine-leucine, 21 — proline, 22 — oxyproline*

**Table 1***Changes in the weight of the male inflorescence of maize and of the nodes internodes below the same*

Weight class	No. of individuals	Limits of weight of male inflorescence mg	Weight of male inflorescence; mg ± s	Weight of				Total weight of male inflorescence + 1—6. internodes; mg ± s
				1+2+3	4	5	6	
				internodes; mg ± s				
1.	58	0.1— 10	4.12 ± 2.72	5.43 ± 2.56	4.72 ± 2.35	8.15 ± 5.23	14.14 ± 8.78	36.14 ± 19.00
2.	22	10.1— 30	15.61 ± 5.10	7.73 ± 4.84	6.36 ± 3.16	11.84 ± 7.81	21.93 ± 13.42	66.31 ± 33.80
3.	21	30.1— 100	57.51 ± 20.93	11.81 ± 4.47	9.66 ± 4.12	17.39 ± 7.78	32.56 ± 17.94	130.60 ± 42.25
4.	16	100.1— 400	185.12 ± 57.92	17.98 ± 7.68	13.07 ± 5.60	27.43 ± 18.97	42.27 ± 20.71	290.56 ± 83.05
5.	8	400.1—1,000	599.25 ± 190.00	30.02 ± 10.77	28.38 ± 9.54	55.52 ± 24.58	110.13 ± 60.90	1 008.00 ± 631.00
6.	17	1.000<	3 450.00 ± 1 290.00	947.30 ± 11.14	98.02 ± 37.80	205.60 ± 59.40	479.71 ± 249.00	4 708.00 ± 1 660.00

acids were present in each case, the others — according to the quality of the chromatogram — were not always capable of quantitative assessment. The quantitative changes of the seven amino acids mentioned are shown in Figs. 2 to 6. The proportional numbers by which — according to LINSKENS' [20] converted datas — identical extinctions can be obtained, are as follows:

1,00 = $\alpha$ -alanine	1,67 = lysine · 2HCl
1,08 = serine	1,75 = arginine
1,33 = leucine	2,42 = glycine
1,58 = valine	2,50 = isoleucine
1,58 = glutamic acid	3,42 = tyrosine

*Serine and lysine run parallel, according to the extinctive coefficients,* in the 2nd weight class, but in classes 2 to 5 lysine exceeds serine, and, com-

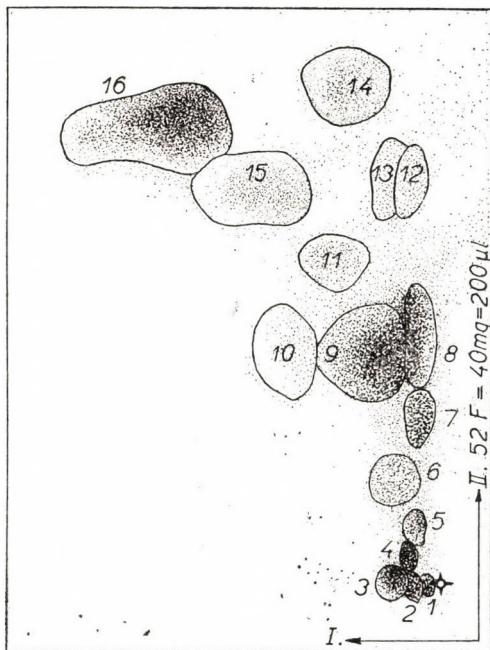


Fig. 5. Bound amino acids of 40 mg fresh matter from the fifth weight class. 1 — cystine-cysteine, 5 — glutamic acid, 6 — serine, 7 — glycine, 8 — lysine, 9 —  $\alpha$ -alanine, 10 — tyrosine, 12, 13 — histidine, 14 — proline, 15 — valine, 16 — isoleucine-leucine

paring classes 5 and 6, the quantity of serine is greater than that of lysine. However, in the first class lysine goes significantly over the values of serine.

The lines of glycine and lysine are running in a fairly uniform way in all classes, although lysine diminishes stronger as glycine from the class 4 on. The values of glycine exceed in all cases those of lysine.

The quantitative changes of *leucine*,  $\alpha$ -*alanine* and *glutamic acid* are of the same direction in classes 1 to 5: each reaches its maximal value in class 2, showing a second maximum in class 5, after that the quantity of leucine and especially that of the glutamic acid diminishes rapidly. On the other hand,  $\alpha$ -*alanine* shows a strongly ascending tendency surpassing the maxima hitherto observed; from class 5 on, the turn is antagonistic in comparison with that of leucine and glutamic acid.

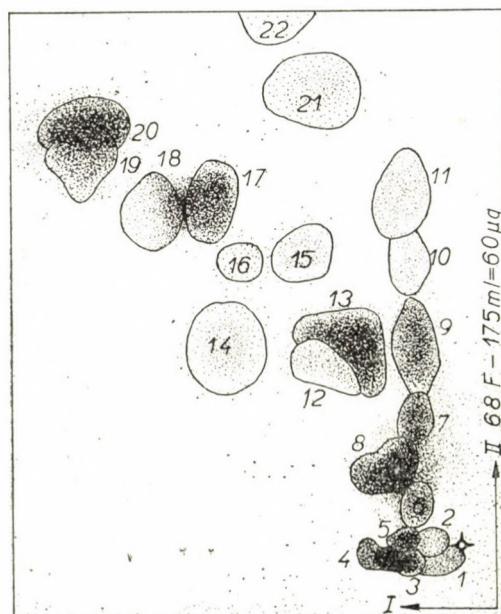


Fig. 6. Bound amino acids of 60 mg fresh matter from the sixth weight class. 1 — cystine-cysteine, 6 — glutamic acid, 7 — glycine, 8 — serine, 9 — lysine, 10 — arginine, 11 — histidine, 12, 13 —  $\alpha$ -alanine, 14 — tyrosine, 17, 18 — valine, 19, 20 — isoleucine-leucine, 21 — proline, 22 — oxyproline

*Valine* rises quickly in classes 1 and 2, like leucine,  $\alpha$ -*alanine* and *glutamic acid*; comparing classes 2 and 3, it decreases, like the above mentioned compounds. Its course is antagonistic in the transition from classes 3 to 5, compared with the compounds in question; it reaches maximal value in class 4, while the other three show their minima. Valine diminishes parallel with glycine and lysine from class 4, and from class 5 on, parallel with leucine too.

The essential changes of amino acid content between classes 1 and 2 — according to the comparison of lines of different type — are: a) the quantity of valine, leucine and glutamic acid increases rapidly, while that of the  $\alpha$ -*alanine* moderately; b) the quantity of glycine and lysine decreases quickly. Maxima are shown in the case of  $\alpha$ -*alanine*, *glutamic acid* and *leucine* in class 2. In class

4 serine, glycine and valine give maxima, while here  $\alpha$ -alanine, glutamic acid and leucine diminish for the first time. Glutamic acid and leucine have second maxima in class 5. From this class on — excepting the increase of  $\alpha$ -alanine — all other amino acids diminish quickly, approaching (as serine, glycine) or surpassing (as lysine, glutamic acid) the small value of class 1. It is only in the case of  $\alpha$ -alanine, valine and leucine that the amounts shown in the first class are surpassed essentially in class 6.

In our experiments proline was present in detectable amounts in each case, but its quantity did not even come near to that found in the developed inflorescence and pollen.

### Discussion

The differentiation and sexualization of the shoot apex is in close connection with the manner of photoperiodic reaction and its effect on metabolism. The morphogenetic effects of photoperiodism relating to *Zea mays* were investigated by several authors [1, 2, 14, 15, 16, 18, etc.], but the effect on protein-metabolism of the shoot apex was not examined. As it is known, protein-metabolism is increased by short-wavelength light — especially blue and violet [4, 30, 31]. Maize, indeed, for the development of normal male inflorescence requires not only long days, but also light relatively rich in short-wavelength radiation. Thus the knowledge of protein-metabolism going on during the development of male inflorescence is not devoid of interest.

According to the free amino acid analyses, completed on samples of *Kalanchoe blossfeldiana* short-day plants, which were partly induced photoperiodically and partly not, the concentration of aspartic acid and  $\alpha$ -alanine of the shoot region of vegetative (*i. e.* long-day) individuals is much greater than in the developed inflorescence of short-day induced plants. Similarly, in all over-ground organs the concentration of aspartic acid is much lower than that of glutamic acid and  $\alpha$ -alanine, but the quantity of aspartic acid in the root surpasses the concentration of the two other compounds mentioned.

The protein analysis of the youngest leaves of the shoot region of *Kalanchoe blossfeldiana*'s photoperiodical induction shows [22] fluctuations in the concentration data of certain amino acids. The change of concentration is not definite for each amino acid between the first and last day of induction.

As for the initial and final concentration of bound amino acids of the developing male inflorescence of *Zea mays*, in our present test we can make similar statements. In spite of the fact that the weight of this organ increased thousandfold, the concentration of many amino acids does not alter essentially. According to the results of our tests, proteins of the male inflorescence of maize are conspicuous in containing much glutamic acid and  $\alpha$ -alanine. Aspartic acid is at the same time totally absent, although significant quantity

of it is present among free amino acids in the over- and under-ground adventitious roots of *Zea*, furthermore in its stalk [6]. Moreover, aspartic acid is contained in its free form in the shoots of 4-day-old maize [8], notwithstanding the fact that in this case the mass of the shoot apex is negligible in comparison with the quantity of stalk and foil.

The above-mentioned data seem to suggest the possibility that absence or presence of certain amino acids may be typical of both the condition of development by stages, and organic metabolism of the plant. Our finding is also in connection with this idea, namely, that the quantity of proline is much smaller in the developing male inflorescence than in the developed one or in the ripe pollen. This might be — according to some researches [26, 29, 28] — the result of the  $\gamma$ -aminobutyric acid  $\rightarrow$  glutamic acid  $\rightarrow$  proline set of reaction. This is supported in our case by the rapid decrease of the quantity of glutamic acid at the end of weight classes 5 and 6, which latter is immediately followed by the ripening of pollen.

Our interpretation of the phenomenon of male sterility is that its genetical ground manifests itself physiologically in increased sensibility in the photo- and spectro-phase. As a result of increased photo-sensitivity, the plant reacts with sterility to unfavourable conditions of light. This must be reflected by the protein metabolism, for the demonstration of which experimental data are available [7, 10, 11, 12].

From the relatively high quantity and increasing tendency of  $\alpha$ -alanine in protein, we are concluding that glycolysis is intensive and supplies the protein-synthesis with sufficient quantity of free  $\alpha$ -alanine. On the other hand, the high glutamic acid content does not according to recent results [24], prove undoubtedly the intensive run of citric acid-cycle. It seems, namely, on the basis of the experiments carried out with  $^{14}\text{CO}_2$ , that glutamic acid does not originate in  $\alpha$ -ketoglutaric acid.

#### LITERATURE

1. Андреенко, С. С., Куперман, Ф. М. (1959) Физиология кукурузы. Изд. Моск. Унив. МОСКВА.
2. Аниканова, З. Ф. (1958) О влиянии длины дня на развитие кукурузы. *Кукуруза*, (6).
3. BONNET, O. T. (1953) Developmental morphology of the vegetative and floral shoots of maize. *Univ. Ill. Agr. Exp. Sta. Bull.* **568**, 5—47.
4. CAYLE, T., EMERSON, R. (1957) Effect of wave-length on the distribution of carbon-14 in the early products of photosynthesis. *Nature*, **179**, 89—90.
5. CHAMAN LAL MADAN (1956) Die Verteilung der freien Aminosäuren in der Pflanze und ihre Beeinflussung durch photoperiodische Induction. *Planta*, **47**, 53—80.
6. Дадыкин, В. П., Игмунова, З. С. (1956) О содержании аминокислот в воздушных корнях кукурузы. *Физиол. раст.* **3**, 259—262.
7. EDWARDSON, J. R. (1955) The restoration of fertility to cytoplasmic male-sterile corn. *Agronomy J.*, **47**, 457—461.
8. FALUDI-DÁNIEL, Á. (1957) Changes in the organic-acid and aminonitrogen contents of peas and maize during germination. *Acta Bot. Hung.*, **3**, 243—251.
9. FISCHER, F. G., DÖRFEL, H. (1953) Das Gift der Honigbiene. II. Die Aminosäuren-Zusammensetzung der Bienengift-Fraktionen. *Biochem. Ztschr.*, **324**, 465—475.

10. FUKASAWA, H. (1954) On the free amino acids in anthers of malesterile wheat and maize. *Jap. J. Genet.*, **29**, 135—137.
11. JONES, D. F., STINSON, H. T., KNOO, U. (1957) Transmissible variations in the cytoplasm within species of higher plants. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **43**, 598—602.
12. КНОО, У., СТИНСОН, Т. Н. Jr. (1957) Free amino acid differences between cytoplasmic male sterile and normal fertile anthers. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **43**, 603—607.
13. Кудрявцев, В. А. (1955) Отношение томатов к интенсивности света в различные фазы формирования репродуктивных органов. *Докл. Акад. Наук СССР*, **102**, 1035—1038.
14. Куперман, Ф. М., Ржанова, Е. И., Любивий, В. М., Любивая, Н. С., Жакипова, А. П., Капитонова, Т. А. (1955) Органогенез соцветий у кукурузы в связи с условиями развития растений. *Вестн. Моск. Унив.*, (9), 121—133.
15. Куперман, Ф. М., Лучшеев, А. А., Шульгин, А. М. (1956) Некоторые закономерности развития и роста кукурузы в новых районах ее возделывания. *Изв. Акад. Наук СССР, сер. Биол.*, (4) 15—38.
16. Куперман, Ф. М., Баранов, С. А. (1958) Этапы органогенеза соцветий у кукурузы. *Кукуруза*, (1) 33—37.
17. LEDIN, R. B. (1954) The vegetative shoot apex in *Zea mays*. *Amer. J. Bot.*, **41**, 11—17.
18. Леванова, Т. А. (1955) Морфогенез мужского и женского соцветия кукурузы. *Журн. общ. биол.*, **16**, 486—497.
19. LEVY, A. L., CHUNG, D. (1953) Two dimensions chromatography of amino acids on buffered papers. *Anal. Chem.*, **25**, 396—399.
20. LINSKENS, H. F. (1955) Papierchromatographie in der Botanik. Springer Verlag, Berlin.
21. METZNER, H. (1954) Unterschiede in der Eiweißfraction bei Lang- und Kurztagsexemplaren von *Kalanchoe blossfeldiana*. *Nachr. Akad. Wiss. Göttingen. Math.-physik. Kl. II b*, **19**.
22. METZNER, H. (1955) Veränderungen der Blattproteine bei photoperiodischer Induction. *Planta*, **45**, 493.
23. NAYLOR, A. W., TOLBERT, N. E. (1956) Glutamic acid metabolism in green and etiolated barley leaves. *Physiol. Plantarum*, **9**, 220—229.
24. NELSON, C. D., KROTOKOV, G. (1956) Metabolism of  $C^{14}$  amino acids and amides in detached leaves. *Canad. J. Bot.*, **34**, 423—433.
25. REBER, E., MACVICAR, R. (1953) The nitrogen composition of cereal grasses. III. Amino acid distribution in field clippings and growing plants. *Agronomy J.*, **45**, 17—21.
26. STETTEN, M. R. (1955) Metabolic relationship between glutamic acid, proline, hydroxyproline, and ornithine. In: *Amino Acid Metabolism*, Johns Hopkins Press, Baltimore, 277—290.
27. STROUN, M. (1958) Photostade et spectrostade. *Physiol. Plantarum*, **11**, 548—563.
28. VOGEL, H. J. (1955) On the glutamate-prolin-ornithine interrelation in various microorganisms. In: *Amino Acid Metabolism*, Johns Hopkins Press, Baltimore, 335—346.
29. VOGEL, H. J., BONNER, D. M. (1954) On the glutamate-prolin-ornithine interrelation in *Neurospora crassa*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **40**, 688—694.
30. Воскресенская, Н. П. (1956) Об образовании органических кислот и аминокислот при фотосинтезе в разных условиях освещения. *Физиол. раст.*, **3**, 49—57.
31. Воскресенская, Н. П., Гризина, Г. С. (1956) К вопросу об использовании растениями  $C^{14}O_2$  в разных условиях освещения. *Докл. Акад. Наук СССР*, **106**, 565—568.

## VERÄNDERUNG DER PROTEINAMINOSÄUREKOMPONENTEN DES ZUR MÄNNLICHEN BLÜTE SICH ENTWICKELNDEN SPROSSVEGETATIONSPUNKTES DES MAISES WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG

Während der Entwicklung der männlichen Blüte von *Zea mays* verändern sich die Aminosäurekomponenten der Proteine quantitativ. Die Konzentrationsveränderungen der einzelnen Aminosäuren sind oftmals antagonistischer Richtung.

Die Proteine der sich entwickelnden Blüte enthalten wesentlich weniger Prolin, als die schon entwickelten Blüte und als der Pollen.

Die Glutaminsäurekonzentration der Proteine ist relativ hoch, der völlige Mangel an Asparaginsäure ist hingegen auffallend.

Während die Gewichtszunahme der männlichen Blüte eine tausendfache ist, verändert sich die Konzentration der einzelnen Aminosäuren der Proteine — abgesehen von schwankenden Veränderungen — nicht wesentlich, weder quantitativ noch qualitativ. Eine Ausnahme davon zeigt  $\alpha$ -Alanin mit seiner verhältnismäßig hohen und steigenden Konzentration.

ИЗМЕНЕНИЕ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ПРОТЕИНОВ КОНУСА НАРАСТАНИЯ КУКУРУЗЫ, РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ В ХОДЕ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ В МУЖСКОЕ СОЦВЕТИЕ

В ходе развития мужского соцветия кукурузы аминокислотный состав протеинов количественно изменяется. Изменения концентрации отдельных аминокислот часто антигенистического направления.

Протеины развивающегося мужского соцветия содержат значительно меньше пролина, чем уже развитое соцветие и пыльцы.

Концентрация глютаминовой кислоты протеина сравнительно высокая, и бросается в глаз полное отсутствие аспарагиновой кислоты.

В то время, как мужское соцветие увеличивается в весе в тысячу раз, в концентрации его протеиновых аминокислот — несмотря на переходные изменения — существенные количественные и качественные изменения не происходят.

KLÁRA SZABÓ, Budapest VIII. Múzeum krt. 4/a. Hungary.



# EFFECT OF PENICILLIN ON TETRAHYMENA PYRIFORMIS, STRAIN GL

## I. MULTIPLICATION AND CHANGE OF FORM

G. NÉMETH and L. CSÍK

INSTITUTE OF BIOLOGY, MEDICAL UNIVERSITY, SZEGED (HEAD: L. CSÍK)

(Received July 20, 1960)

### Summary

The experiments described had the purpose to determine the effect of different concentrations of crystalline penicillin on the growth rate and shape of *T. pyriformis*, strain GL.

As compared with the controls, the number of animals was higher in media containing 500 and 1000 U/ml, and lower in media containing 2000 to 10 000 U/ml penicillin. Animals grown on penicillin containing media were shorter and narrower than the controls. A change of shape was due to that length of the animals seemed to be more affected by penicillin than their width. It is suggested that penicillin influences the SH system and that this influence may be responsible for the morphological changes.

Ever since FLEMING discovered that the active principle of *Penicillium notatum*, termed by him penicillin, dissolved the colonies of staphylococci, reports without number have been published concerning the question as to which pathogens and other microorganisms are promoted or inhibited in their growth by penicillin. It has been suggested by certain authors, e. g. by NICKERSON [7] in respect of yeast cells, that some of the antibiotics cause morphological changes in unicellular organisms. Great as the number of these publications is, the mechanism through which penicillin produces its action is essentially still unelucidated and we are still unable to tell how penicillin exerts its bacteriostatic or bactericidal effect.

KIDDER and his group [1, 5] performed a number of investigations at the beginning of the 1950s concerning the culture of *Tetrahymena pyriformis* and the composition of the medium needed for its growth. *T. pyriformis* is known to occupy a special position by virtue of the fact that it is a comparatively large unicellular organism and possesses an enzyme system which is exceedingly similar to that of the higher orders. *T. pyriformis* seemed, therefore, to be particularly suited for the study of the action mechanism of penicillin.

JIRA [3] and JIROVEC [4] found in 1949 that higher concentrations of penicillin-solution inhibited the growth of *Tetrahymena*. Later NARDONE [6] demonstrated that low concentrations of streptomycin promoted the propagation of *Tetrahymena*. GROSS [2] observed that, exposed to the action of chloromycetin and aureomycin, individuals of the *T. pyriformis* changed their size and shape as also the rate of multiplication.

The first object of our experiments was to ascertain changes in the rate of propagation of *Tetrahymena* exposed to the action of penicillin. It was hoped that their results as also further researches following from them would supply noteworthy data for a wider knowledge in this field.

### Method

We employed the generally known methods of cultivation. We started with a single cell and studied the population derived from it. Initially, the protozoon was transferred to a medium of calf brain and incubated in the dark at 25° C. The number, shape and size of the animals were examined 5 days later. DR. MÜLLER of the Budapest Medical University warned us that media of calf brain, prepared at various times, might show different compositions. We knew from the afore-mentioned communication of KIDDER *et al.* that a definitely proportioned composition of various amino acids, vitamins, vitaminlike substances and inorganic salts was needed for the nutrition of *Tetrahymena* and that, moreover, any quantitative change in these components might affect the growth, shape and size of the protozoa. With a view to preventing our results being impaired by influences of the medium, we adopted 0.85 per cent peptone as culture medium. It should be noted that the effect of penicillin seemed to be essentially the same in both cases.

In the experiments for the test of multiplication, 2 cells, each, were placed on sterilized slides covered with 0.2 ml of the nutrient medium. This done, we added crystalline pulverized penicillin to the cultures. The doses were so chosen as to obtain cultures containing, respectively, 500, 1000, 2000, 5000, 10 000 and 20 000 U per ml of the medium. Slides with medium containing no penicillin served as controls. Ten test and control cultures were grown at each level of penicillin concentration. The slides were then placed in a wet chamber and incubated in the dark at 25° C for 12 hours. After this, we counted the number of animals on the slides and examined their shape under the microscope. This process was performed ten times so that the figures given in this paper represent the mean values obtained, each, from a hundred cultures.

Microscopic inspection showed differences in the shape and size of the animals according to variations in penicillin concentration. In order to go to the core of the matter we resorted to mass cultivation. After pipetting 50 ml of nutrient medium into each of several Erlenmeyer flasks of 250 ml, we sterilized them by autoclaving. This done, each flask was inoculated with a single protzoon. Incubation in the dark at 25° C during 5 days was followed by the addition of pulverized crystalline penicillin in such doses as to obtain concentrations of 500, 1000, 2000, 5000 and 10 000 U per ml of medium in the different flasks. Aeration of the medium was achieved by shaking the flasks every morning and afternoon during the time of cultivation. The treatment was repeated after 24 hours with the same doses of penicillin. A day after the last treatment, 500 animals were removed at random from each flask and their length and width determined. Prior to measurements, the ciliary motion of the animals was paralysed by the addition of 0.5 per cent  $\text{Ni}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  to the culture medium. Length and width were measured with the aid of an ocular micrometer. Values read there at a  $600 \times$  magnification are presented in the table, and these same values served also for the statistical evaluations. A multiplication of these values by 10.85 gives the length and width of the animals in  $\mu$ . Fluctuations of temperature did not exceed  $\pm 0.1^\circ\text{C}$  in the cultures, nor did repeated examinations reveal any significant change in their pH value.

### Results

#### *The number of animals*

The number of animals counted after the above-described procedures is shown in Table 1. The first column indicates units of penicillin per ml of the medium, the second contains the number of animals, together with the standard deviation.

**Table 1***Number of animals grown on media with different concentrations of penicillin\**

Penicillin concentration U/ml	Number of animals
Control	5.6 ± 0.02
500	7.6 ± 0.04
1000	6.6 ± 0.07
2000	4.8 ± 0.03
5000	3.6 ± 0.08
10 000	3.3 ± 0.06
20 000	0.9 ± 0.03

It can be seen from Table 1 that media treated with 500 and 1000 U of penicillin per ml, respectively, contained more protozoa than the control cultures. The number of animals decreased in line with increasing penicillin concentrations. All differences proved to be statistically significant.

*Dimensions of the animals*

It has been noted that 500 animals were measured from each culture. Results are assembled in Table 2 in which  $v$  and  $v_1$  mean the variation coefficients.

Fig. 1 illustrates the mean values of length and width at different penicillin concentrations.

**Table 2***Dimensions and size index of animals grown on media with different concentrations of penicillin\**

Penicillin concentration U/ml	Length of animals ( $\mu$ )	$v$	Width of animals ( $\mu$ )	$v_1$	Size index Si
Control	39.0 ± 0.07	14.7	12.4 ± 0.05	18.9	56.9
500 .....	22.3 ± 0.05	18.1	14.5 ± 0.001	23.9	65.6
1000 .....	22.9 ± 0.06	20.6	15.2 ± 0.001	17.7	67.5
2000 .....	28.1 ± 0.08	22.2	15.8 ± 0.001	18.6	63.8
5000 .....	28.5 ± 0.05	14.3	16.1 ± 0.001	14.2	63.0
10 000 .....	30.3 ± 0.06	16.8	16.6 ± 0.001	25.8	55.1

\* For the sake of brevity, only mean values and their standard deviations are given in our tables. The original figures can be obtained from our Institute.

Employing the *t*-test, we found that the lengths and widths of the animals as measured in the different media were, from a statistical point of view, significantly different from those of the controls (*P* was in every case  $< 0,01$ ).

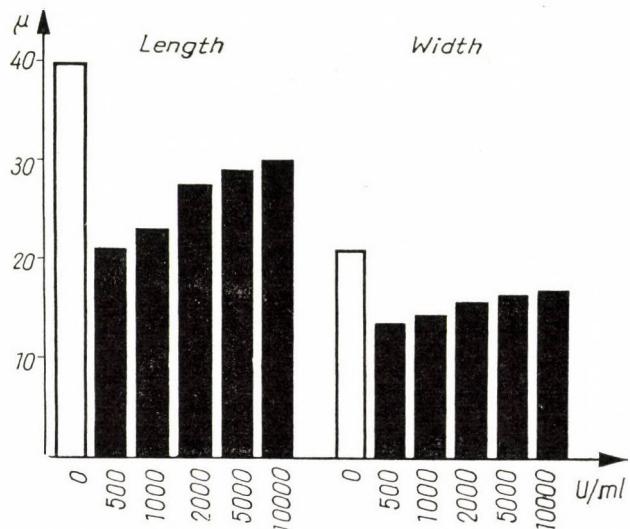


Fig. 1. Changes in the body measurements of *Tetrahymena pyriformis* under the influence of different penicillin concentrations

As is evident from Fig. 1, decrease in length generally exceeded that of width. This is substantiated by the values obtained with the aid of the following formula:  $S_i$  (index of size) =  $\frac{\text{width}}{\text{length}} \times 100$ . Table 2 gives the values for the different cultures.

It can be seen that, up to 5000 U of penicillin per ml of the medium, the values are superior, and at 10 000 U/ml inferior, to the size index of the controls. Or, in other words, length — up to 5000 — decreases at a higher rate than width, while it is the other way round at a concentration of 10 000 U/ml.

### Discussion

Our experimental results seem to prove that, generally speaking, penicillin affects the propagation of *Tetrahymena* — its rate increases at low (500 U/ml, 1000 U/ml), and decreases at higher concentrations. That the degree of penicillin concentration produces effects of this nature is well known from bacterial experiments. That they would manifest themselves also in the case of *Tetrahymena* was only to be expected after the results of JIRA [3], JIROVEC

[4] and especially those of GROSS [2]. Our own results are in perfect harmony with their findings.

Worthy of note is the fact that the number of animals was greater on media with low concentrations of penicillin than that observed in the control cultures, while their size was larger in the latter. It remains to be ascertained whether the smaller size of animals in cultures grown on media with a low concentration of penicillin is due to a rapid rate of multiplication with which the growth in size cannot keep pace, *i. e.* whether one has to deal with a phenomenon like that occurring at the second stage of spermiogenesis and ovogenesis, or whether the phenomenon in question has some other cause.

Our observations concerning changes in the shape and size of the animals deserve particular mention. We have already noted that there exist several reports on changes of this nature, occasioned by certain antibiotics, for instance that of GROSS [2], referred to in the introductory part of this paper, who found that aureomycin and chloromycetin changed not only the rate of propagation of *Tetrahymena* but their shape as well. Our results show that this applies also to penicillin.

We are led to the conclusion that penicillin affects the metabolism of *Tetrahymena*. Our recent work aims at the elucidation of this question. Researches into enzymatic activity, as also observations in connection with the Feulgen reaction, and photometric determinations of nucleic acids seem to show that penicillin modifies the activity of certain enzymes, influences nucleoplasmic relationships and affects the quantity (or, rather, the reciprocal proportion) of desoxyribonucleic acid and ribonucleic acid. It is of course possible that, together with the nucleic acids, also the system containing the SH-group undergoes a certain change as has been demonstrated by NICKERSON [7] in connection with morphological changes in respect of other microorganisms. The fact that penicillin reduces length more markedly than width argues in favour of this assumption. Let us add that UV rays produce, according to our observations, a similar effect on *Tetrahymena*. Investigations in this respect are in progress.

#### LITERATURE

1. DEWEY, V. C., PARKS, R. E., KIDDER, G. W. (1950) Growth responses of *Tetrahymena geleii* to changes in the basal media. *Acta Biochem.*, **29** 281—290.
2. GROSS, J. A. (1955) A comparison of different criteria for determining the effects of antibiotics on *Tetrahymena pyriformis* E. J. *Protozool.*, **2**, 42—47.
3. JIŘA, J. (1949) The influence of sulphonamides on protozoa in vitro. *Vest. Čsl. Zool. spol.*, **13** 191—215.
4. JIROVEC, O. (1949) Der Einfluss des Streptomycins und Patulins auf einige Protozoen. *Experientia*, **5** 74—77.
5. KIDDER, G. W., DEWEY, V. C., HEINRICH, M. R. (1954) The effect of non-ionic detergents on the growth of *Tetrahymena*. *Exp. Cell. Res.*, **7** 256—264.

6. NARDONE, R. M., BLASZCZYNSKI, H. J. (1954) Growth effects induced in *Tetrahymena pyriformis* by streptomycin and its components. *J. Exp. Zool.*, **125**, 119—126.
7. NICKERSON, W. J., VAN RIJ, N. J. W. (1949) The effects of sulphhydryl components, penicillin and cobalt on the cell-division mechanism of yeasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **3**, 461—475.

## WIRKUNG VON PENICILLIN AUF TETRAHYMENA PYRIFORMIS, STAMM GL.

### I. Vermehrung und Körperform

Es wurde untersucht, welche Wirkungen die verschiedenen Konzentrationen des kristallinen Penicillins auf die Vermehrungsintensität und Form des *T. pyriformis* GL-Stammes ausüben.

Bei den Penicillinkonzentrationen 500 bis 1000 E/ml entwickelten sich mehr, bei den Penicillinkonzentrationen von 2000, bis 20 000 E/ml weniger Tiere als in den Kontrollkulturen.

In allen penicillinhaltigen Nährböden hatten sich kürzere und schmalere Tiere entwickelt als in den Kontrollkulturen. Im allgemeinen wirkte Penicillin auf die Länge der Tiere stärker als auf die Breite, was zu einer Formveränderung führte.

Es wird als wahrscheinlich angesehen, daß Penicillin das SH-System beeinflußt und die Größen-bzw. Formveränderung damit zusammenhängt.

## ВЛИЯНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНА НА ТЕТРАХИМЕНА PYRIFORMIS ШТАММА GL.

### I. Размножение и изменение формы

Исследовалось действие различных концентраций кристаллического пенициллина на интенсивность размножения и форму *T. pyriformis* GL.

При концентрации пенициллина 500—1000 Е/мл развивалось больше, а при концентрации пенициллина 2000, 5000, 10 000, 20 000 Е/мл развивалось меньше животных чем в контрольных культурах.

На всех пенициллиновых питательных средах развивались более короткие и более узкие животные, чем в контрольных культурах. В общем пенициллин сильнее влиял на длину животных, чем на их ширину, и этим обусловливалось изменение формы.

Авторы считают весьма вероятным, что пенициллин оказывает влияние на систему SH и этим влиянием связано также изменение величины или же формы животных.

GÁBOR NÉMETH, Szeged, Kossuth L. sugárút 35, Hungary.

LAJOS CSÍK, Szeged, Juhász Gyula út 5, Hungary.

# CONTRIBUTIONS TO THE HISTOCHEMISTRY OF THE NERVOUS SYSTEM OF PLANARIANS

LENKE R. GAZSÓ, L. J. TÖRÖK and GY. RAPPAY

DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY, BUDAPEST MEDICAL UNIVERSITY (HEAD: I. TÖRÖK)  
AND INSTITUTE OF EXPERIMENTAL MEDICINE OF THE HUNGARIAN ACADEMY OF SCIENCES, BUDAPEST

(Received September 26, 1960)

## Summary

In the methodical part of their investigations authors have searched for such staining methods as are suitable to stain electively enough nervous elements of the planarians, being simple and quick at the same time. They have found that, among the known staining methods, the HANSEN molybdate-hematoxylin as well as MALLORY and GIEMSA stainings are most suitable to stain intensively the nervous fibers and nerve endings, however, the electivity of these methods is not sufficient. One can obtain a good and almost elective nerve-staining on slides after steeping with a solution of 4% ammonium-molybdate and staining with a thionin solution (or that of some other basic stains) of a very low concentration. For all these staining methods, the ZENKER fixation was found as most suitable. The enzyme histochemical investigations have been made with the aim of searching for suitable histochemical methods for the morphological study of nerve elements, on the one hand, as well as of finding such ones for the registration of their functional state, on the other. In two fresh-water planarian species (*Dugesia lugubris* and *Dendrocoelum lacteum*), the alkaline phosphatase and specific cholinesterase activity of the nervous system was studied by using the methods of GÖMÖRI and MENTEN—JUNGE—GREEN, respectively that of KOELLE—FRIEDENWALD. As for *Dugesia lugubris*, positive alkaline phosphatase reaction was found in the whole central nervous system, with localization in the nuclear membranes, nucleoli and nerve fibrils of the nerve cells. Positive reaction was found also in the motor nerve fibers establishing the neuromuscular connexions. Here, the reaction was much more intensive as in the central nerve fibers. Images got by the GÖMÖRI method are suitable also for studying the morphology of the nerve elements, as well as for distinguishing from each other motory and sensory fibers, respectively their endings. Authors suppose the alkaline phosphatases to play an important role in neuromuscular transfer of nerve impulses. As for specific cholinesterase, positive reaction was only found at the somatic neuro-muscular junctions, with localization in the motory nerve endings. A striking lack for positive cholinesterase reaction in the pharynx may be explained, in the authors' opinion, by morphological and physiological differences in the innervation of the somatic and visceral musculature. In the *Dendrocoelum lacteum*, authors could find, surprisingly enough, no positive reaction either for alkaline phosphatase, or for cholinesterase. Taking into consideration this fact, as well as the results of investigations performed in other directions, the authors suppose the much weaker regenerative capacity of that species, in comparison with *Dugesia lugubris*, to be connected with biochemical and physiological differences existing between nerve cells of the central nervous system of the two species.

## Introduction

There are, in the first place, two facts which imply that a study of the nervous system of Turbellaria is an actual and important task. The first is the special place of Turbellaria as to the evolution of the nervous system. Here begins, concurrently with the formation of a head, the more intensive centraliza-

tion of the nerve cells and this leads — apart from the remaining primitive nerve net — to the development of the first, primitive head ganglion. Various stages of that process can well be traced in orders of this worm class.

The second important fact elucidated by investigations of the late years [19, 10, 11, 16, 17, 3] is that the central nervous system, primarily the head ganglion of Turbellaria display a neuro-secretory, or more precisely neuro-humoral activity having important effects on morphogenetic processes of regeneration. The so-called "organizine" produced by the head ganglion induces eye-differentiation in the regeneration blastema and inhibits the development of supernumerary head ganglia or eyes.

Morphological examination of the nervous system of Turbellaria is rendered very difficult by the fact that various methods, as impregnations, vital stainings generally used for elective detection of the nerve elements, have given, in this case, no satisfactory results at all. Searching for such methods remains, naturally, an important task for the future, too. Histochemical investigation of the nervous system must, however, come into prominence. These methods, namely, being more elective, might result in morphological detection of the nervous elements and, what is more important, they may deliver data about different functional conditions of the nervous system. Functional differences existing between various regions of the nervous system of the same specimen or between the nervous system of different species can be elucidated primordially by such methods. Investigations of this type are of great importance for studying regeneration phenomena, because they may be helpful in interpreting the significant individual and species differences regarding regenerative capacities as well as the intensity of regenerating processes.

From our point of view, investigation of regeneration problems has necessitated morphological and histochemical examination of the nervous system. *Dugesia lugubris* and *Dendrocoelum lacteum* fresh-water planarian species, both often used for regeneration experiments, were chosen as material, considering the significant differences between them not only in morphological and physiological characteristics, but in regenerative capacity, too. The aim of our investigations of a methodological character was searching for staining suitable for elective detection of the nerve elements. The histochemical investigations were confined, for the time being, to certain enzyme reactions.

### Material and methods

Fully-developed specimens of *Dugesia lugubris* and *Dendrocoelum lacteum* (Tricladida, Planariidae), after having starved three days, were stretched and killed by means of formalin solution (dilution 1 : 9) and than immediately fixed in the suitable fixative (ZENKER solution, 10% neutral formalin, 80% cold alcohol). Fixed materials were embedded into paraffin, gelatin or by way of the freeze-dry procedure, then sectioned at 5  $\mu$ .

As to the staining methods, the EHRLICH hematoxylin, HANSEN molybdate-hematoxylin, as well as MALLORY and GIEMSA staining have been tested or applied, respectively,

among others. Starting from the known molybdate methods of DONAGGIO and BETHE [14], we have made trials to stain sections with strongly diluted solutions of thionine and other basic stains after steeping in 4% ammonium-molybdate solution.

As far as histochemical reactions are concerned, tests for alkaline phosphatase and specific cholinesterase have been performed. For detection of the alkaline phosphatase, we partly used fixed materials and the classic method of GÖMÖRI, partly 10  $\mu$  thick sections made of unfixed, fresh material by means of cryostate technics and the azo-dye method of MENTEN, JUNGE and GREEN. Detection of specific cholinesterase was performed after KOELLE and FRIEDENWALD using the incubation in acetyl-thiocholin-iodide (pH = 6.2).

## Results

### *Detection of the nerve elements by staining methods*

Staining of the nerve elements was studied, in the first place, in central regions of the nervous system. The central nervous system of the planarians contains, according to several authors [12, 8, 18, 7, 10, 16, and others] following parts: head ganglion continuing itself into the two ventral nerve trunks, commissures of the head ganglion and the nerve trunks and lateral nerves.

The common hematoxylin stainings are, in general, less suitable for studying the nervous structures, because they can stain the nerve fibers only very faintly, or not at all. According to GELEI [7], it is the APÁTHY hematein that can best be used for detection of the nerve elements and he observed that this sort of hematoxylin stains the sensory fibers more intensively than the motory ones. We have received similar results by using EHRLICH hematoxylin (Fig. 1). Among other things, we have found that, on material embedded by means of the freeze-dry technic, the sensory nerve endings of the epidermis can intensively be stained with the EHRLICH hematoxylin (Fig. 2). From the hematoxylin stainings hitherto known, it was the HANSEN molybdate-hematoxylin that stained the nerve fibers most intensively (Fig. 3). This staining procedure, however, has some drawbacks, namely, it stains also other tissues very markedly, a fact which renders the analysis of the histological images more difficult. Owing to this consideration, we tried to test various modifications, too, of this staining. We found that, in the case of planarians, it is more suitable to stain with hematoxylin or other basic stains (thionine e.g.) after steeping in 4% ammonium-molybdate. By staining with strongly diluted stain-solutions for a longer time, progressively, nerve fibers are detected electively enough, while other tissue elements, excepting cell nuclei, will not be stained too intensively (Fig. 4). These stainings combined with a foregoing steep in ammonium-molybdate can strongly stain also the sensory nerve endings, for example the retinal clubs of the eye.

As the other, commonly used staining methods the MALLORY and GIEMSA, respectively MAY—GRÜNWALD—GIEMSA ones give sufficiently good results, although the intensive staining of the various tissues represents, in these

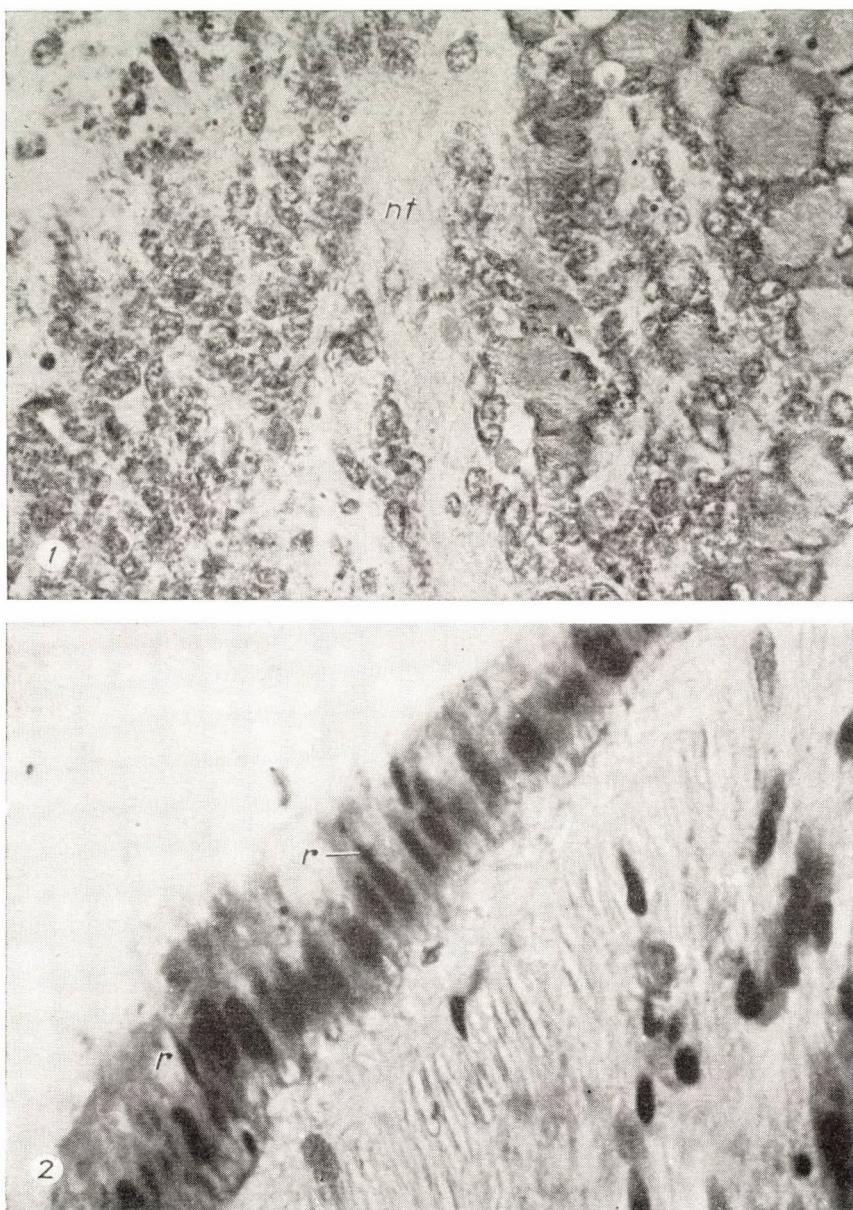


Fig. 1. Longitudinal section of the ventral nerve trunk of *Dugesia lugubris*. nt — nerve trunk. EHRLICH hematoxylin. Obj. 40 ×

Fig. 2. Section from the epidermis of *Dugesia lugubris*. r — sensory nerve ending. Freeze-dry embedding, H and E staining. Obj. 40 ×

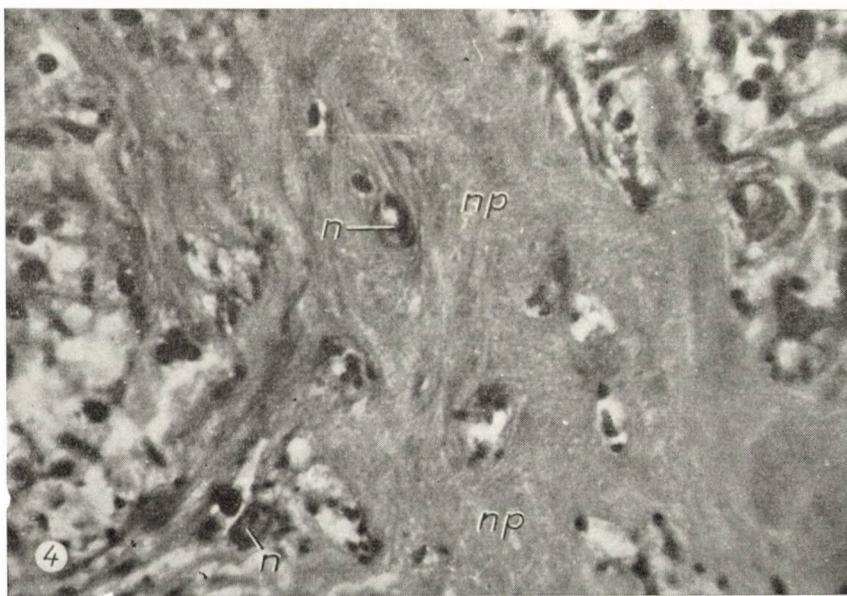
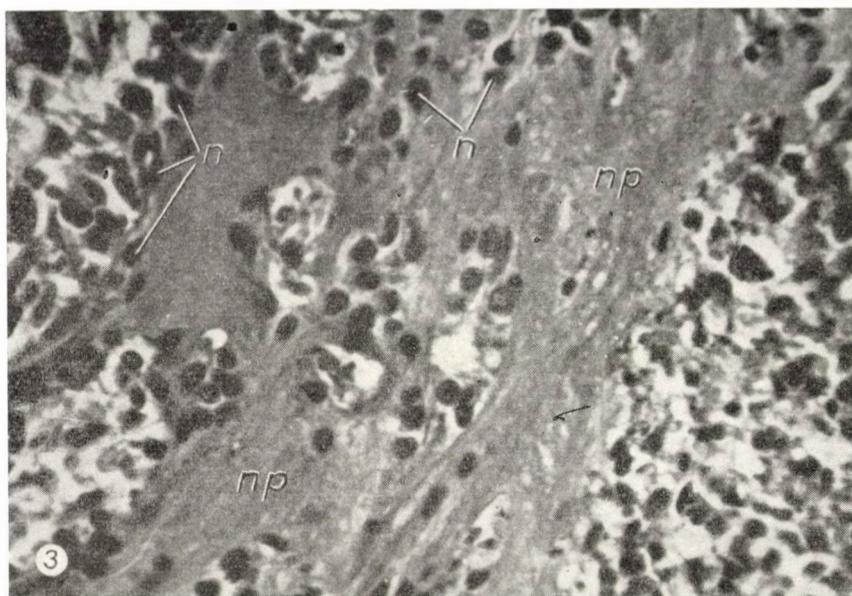


Fig. 3. Longitudinal section from head ganglion of *Dugesia lugubris*. np — neuropil, n — nerve cell nuclei. HANSEN molybdate-hematoxylin. Obj. 40 ×

Fig. 4. Longitudinal section from head ganglion of *Dendrocoelum lacteum*. np — neuropil, n — nerve cell nuclei. Ammonium-molybdate and thionine staining. Obj. 40 ×

cases too, a disturbing factor. As far as the MALLORY staining is concerned, the intensive colouration of the nerve fibers and the retinal clubs with aniline blue may probably be due to the steep in phosphor-molybdic-acid.

#### *Demonstration of alkaline phosphatase in the nervous system*

On preparations treated with GÖMÖRI method we observed that the positive reactions given by various cells, tissues and organs show very striking differences as to intensity. Among the organs, it was the pharynx that reacted most intensively (Fig. 11). From organs embedded into the mesenchyme

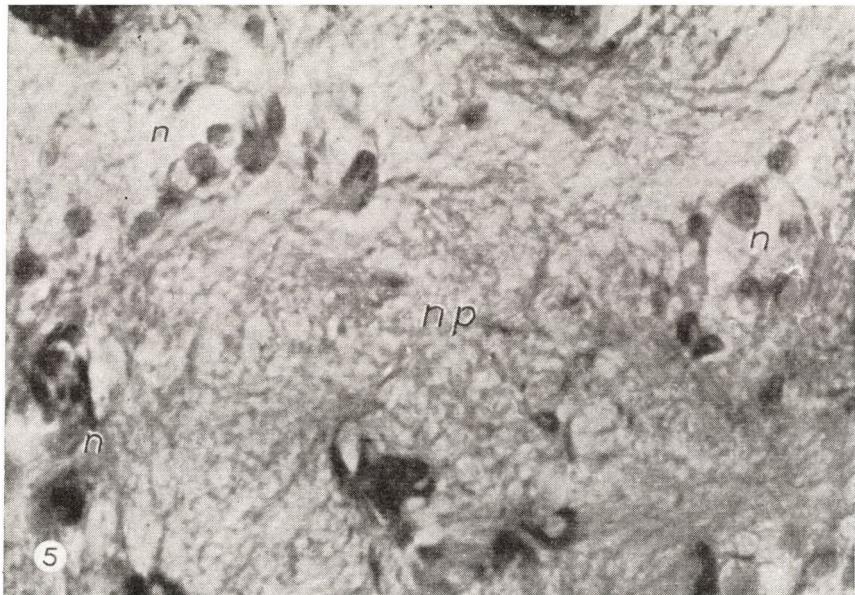


Fig. 5. Section from the head ganglion of *Dugesia lugubris*. np — neuropil, n — nerve cell nucleus. GÖMÖRI alkaline phosphatase reaction. Obj. 40 ×

(parenchyma), elements of the excretory system had given the most intensive reaction, surpassing all other organs or tissues. Also the subepidermal musculature had shown, as a whole, intensive reaction to alkaline phosphatase (Fig. 9).

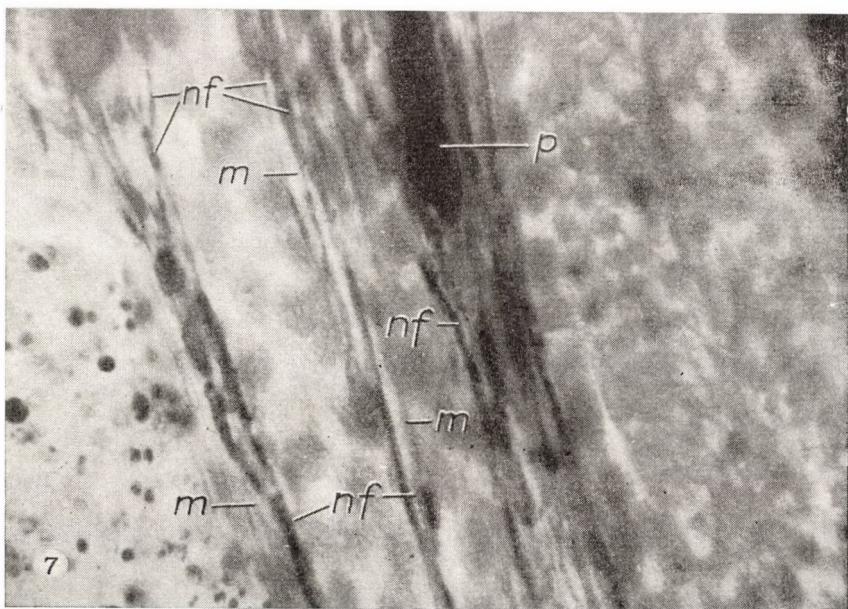
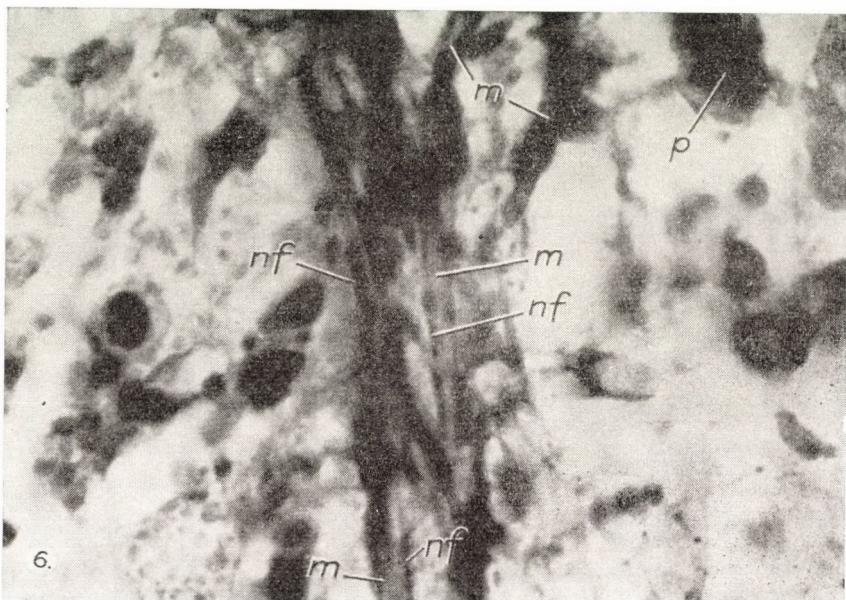
As to the alkaline phosphatase activity of the central nervous system, positive reaction could be demonstrated in each region of it, as well as in the main sensory nerves originating from the head ganglion. From different structural elements of the nerve cells, it was the nucleoli, the nuclear membranes and the nerve fibers which reacted positively. In the region of the perikaryon

we could find no reaction to be described as a positive one. The enzyme activity of the nerve fibers appears to be bound to very fine fibrils, and, accordingly, the appearance of these preparations is such as that of the ones stained for the detection of nerve fibers, respectively nerve fibrils (Fig. 5). One may suppose, on this basis, that it is the neurofibrils, which give the alkaline phosphatase reaction. It is possible that also the outer plasmatic membrane of the nerve fibers produces positive reaction, however, the latter is not distinguishable in the sections from that of neurofibrils. Intensity of the alkaline phosphatase reaction has shown no discernible differences between various regions of the central nervous system.

As far as the alkaline phosphatase activity of the peripheral nervous system is concerned, we have first of all studied the motor nerve fibers and nerve endings establishing neuro-muscular junctions. In examining the stained preparations used as controls, we observed that stainings combined with foregoing steep in ammonium-molybdate are the most suitable ones for morphological demonstration of the neuro-muscular junctions. Morphology of the neuro-muscular junctions was found to be similar to the descriptions of GELEI [7] about motor nerve fibers of *Dendrocoelum lacteum*. We ourselves have observed the motor nerve fibers and end-branchings to travel parallelly with the muscle fibers both in the dorso-ventral muscle bundles and the subepidermal musculature. These motor fibers and end-branchings, while becoming thinner and thinner, do ramify at certain points and show thickenings of various shape and size, resembling end-bulbs, end-feet or spindles etc.

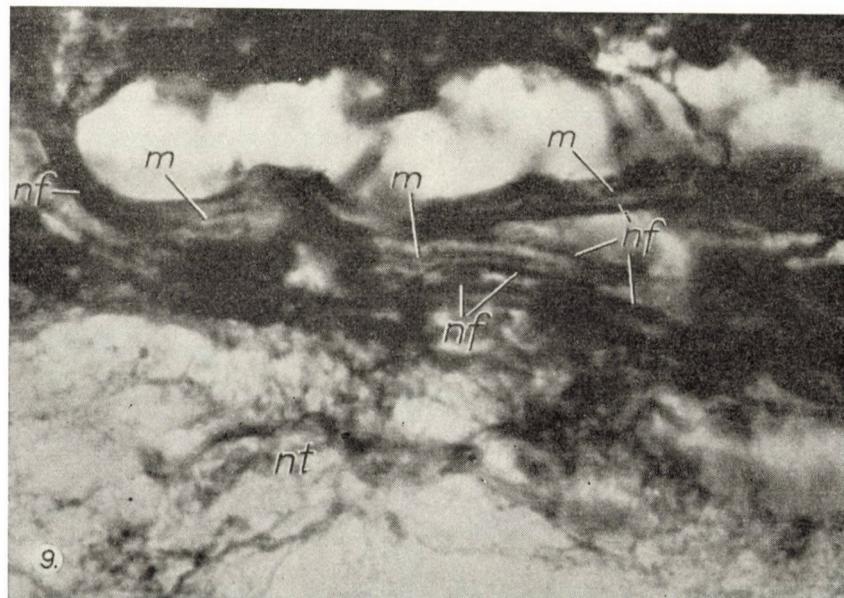
On preparations treated with the GÖMÖRI method, the enzyme activity of the motor nerve fibers was found to be much more intensive than that of the central ones. Consequently, the morphological appearance of these nervous elements bore, on these histochemical preparations, great resemblance to nervous pictures obtained by means of silver impregnation methods (Figs. 6 to 9). The GÖMÖRI alkaline phosphatase method seems, accordingly, to be suitable also for morphological investigation of the planarian nervous system. Leaving a more profound morphological analysis aside for the moment, we only mention that the somatic musculature seems, according to these GÖMÖRI preparations, to possess a very rich motor innervation. This conclusion can be supported also by electron microscope observations (Figs. 10 and 11).

As to the innervation of the visceral musculature of the pharynx, here we only note that the above-mentioned, strikingly intensive alkaline phosphatase reaction of the pharynx can be due, in the first place, to the high enzymatic activity of the motor nerve fibers. The morphological appearance of the neuro-muscular junction is similar to that observed in the somatic musculature (Figs. 12 and 13).



*Fig. 6.* Muscle cells (m) from a dorso-ventral muscle group of *Dugesia lugubris* with the motor nerve fibers (nf); p — protonephridium giving intensive reaction. GÖMÖRI alkaline phosphatase reaction. Obj. 20 ×

*Fig. 7.* Muscle cells (m) and motor nerve fibers (nf) from a dorso-ventral muscle group of *Dugesia lugubris*. p — protonephridium. GÖMÖRI alkaline phosphatase reaction on freeze-dried and embedded material. Obj. 40 ×



*Fig. 8.* Motor nerve endings in a dorso-ventral muscle group of *Dugesia lugubris*. *m* — muscle cells, *t* — part of a motor nerve ending. GÖMÖRI alkaline phosphatase reaction. Obj. 40  $\times$

*Fig. 9.* Longitudinal section of the epidermis and the ventral nerve trunk of *Dugesia lugubris*. The enzyme reaction of the motor nerve fibers is much more vigorous than that of the central nerve fibers. *nt* — nerve trunk, *m* — muscle cells with motor nerve fibers (*nf*) laying between or on them. GÖMÖRI alkaline phosphatase reaction. Obj. 20  $\times$

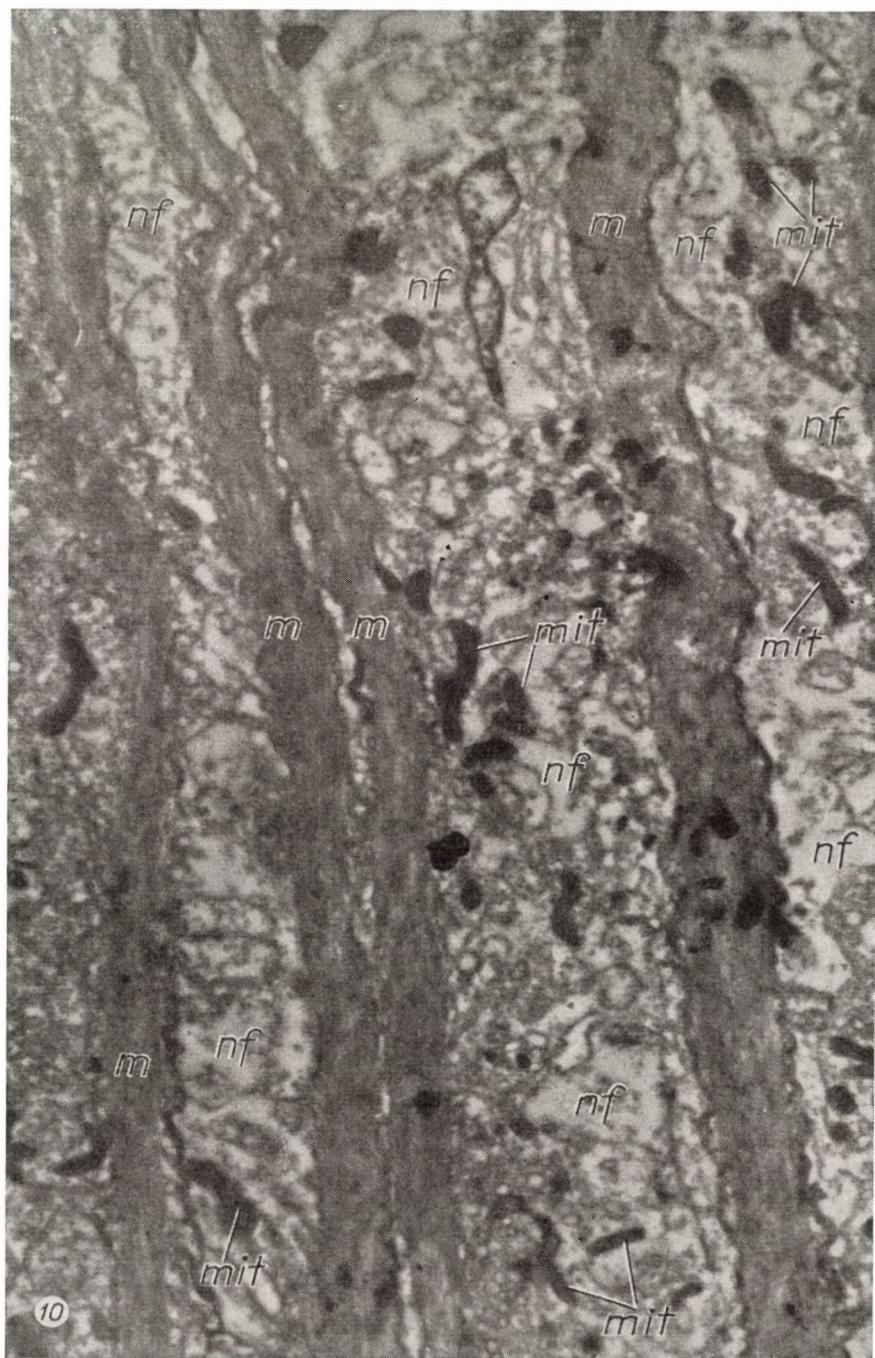


Fig. 10. Section from the subepidermal musculature of *Dugesia lugubris*. The space between the parallelly arranged muscle cells (*m*) is filled with sections of the motor nerve fibers (*nf*). *mit* — mitochondrion in the nerve fiber, *fil* — neurofilaments. Electron micrograph. 12 050 ×

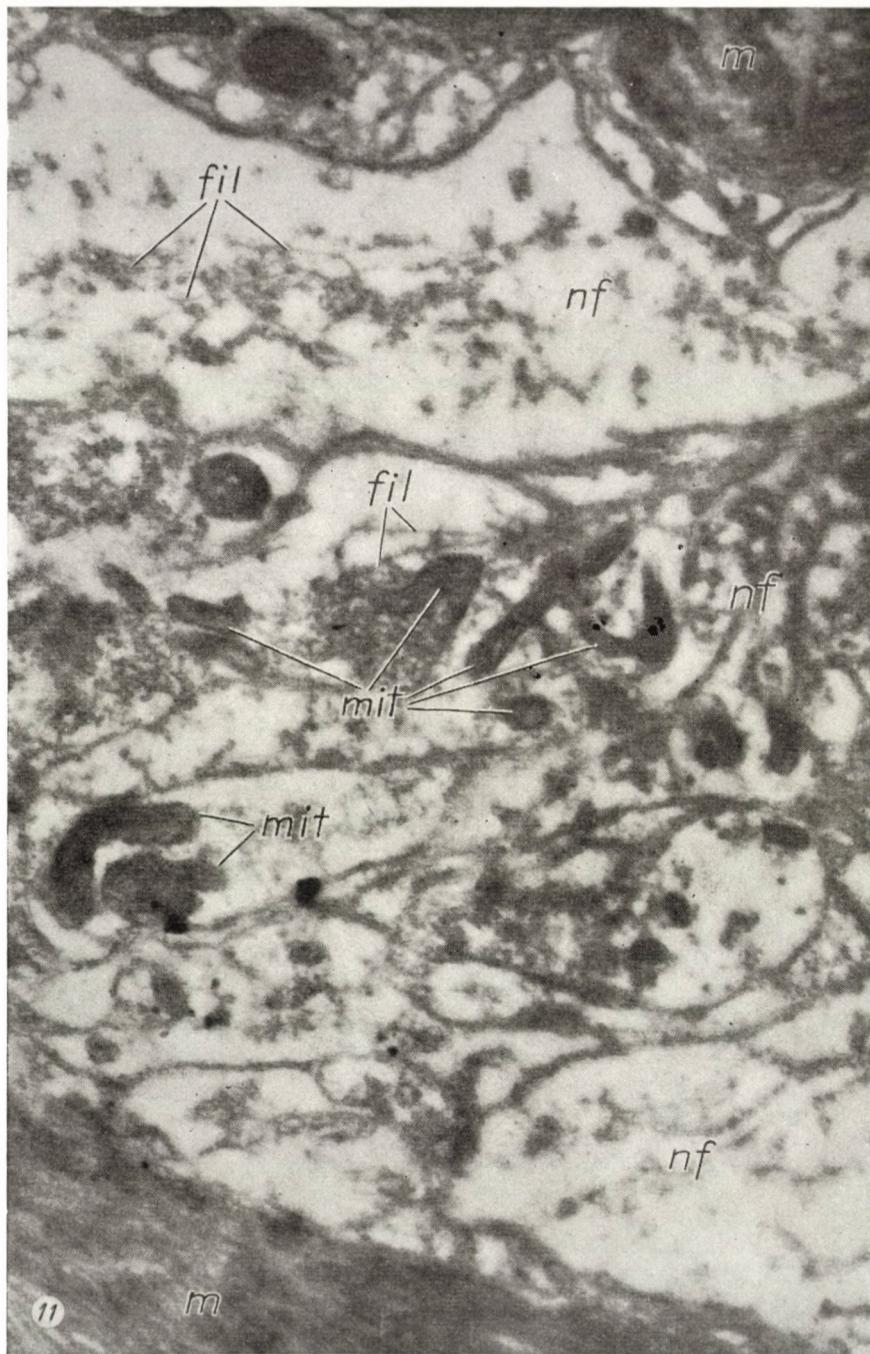
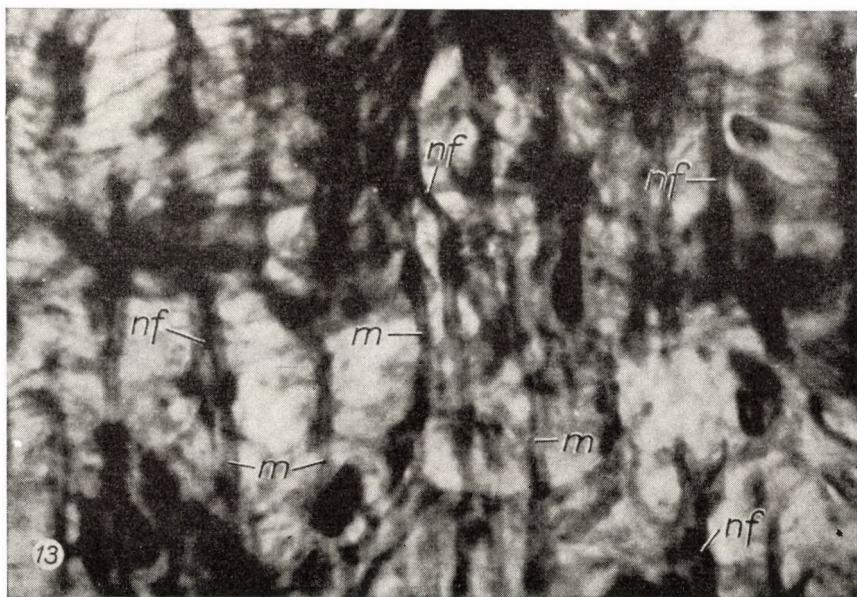


Fig. 11. The same as in Fig. 10. Electron micrograph. 20 800  $\times$



*Fig. 12.* Longitudinal section of the pharynx of *Dugesia lugubris*. A part from the region of the pharynx-base. *ph* — the wall of the pharynx, *e* — outer epidermis of the pharynx, *p* — parenchyma. GöMÖRI alkaline phosphatase reaction. Obj. 10 ×

*Fig. 13.* Longitudinal section of the pharynx of *Dugesia lugubris*. Radial muscle cells (*m*) and motor nerve endings (*nf*) are visible. GöMÖRI alkaline phosphatase reaction. Obj. 20 ×

*Demonstration of specific cholinesterase in the nervous system*

After having found the alkaline phosphatase reaction to be positive, it seemed us reasonable to examine also the presence of the specific cholinesterase which is generally characteristic of the neuro-muscular junction. Preparations made from *Dugesia lugubris* showed positive reaction at places corresponding to the motor nerve-endings and the morphological appearance of the enzyme localization was similar to that obtained by alkaline phosphatase reaction.

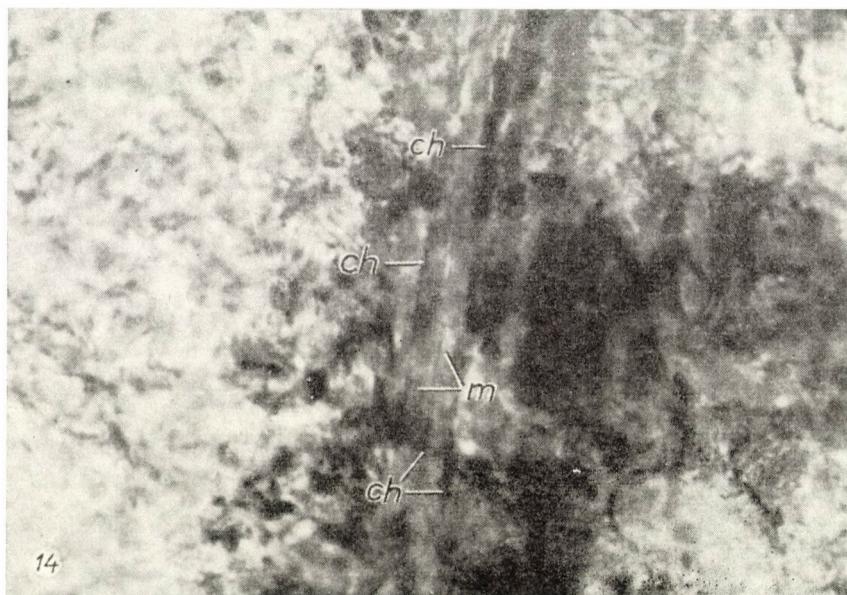


Fig. 14. Section of the subepidermal musculature of *Dugesia lugubris*. Positive reaction for cholinesterase shows itself localized at the motor nerve endings (ch). m — muscle cell. KOELLE—FRIEDENWALD method. Obj. 20 ×

tase reaction (Fig. 14). Also the fact should be noted that in the pharynx, extremely rich both in muscle elements and motor nerve fibers, we could not detect any sign of specific cholinesterase activity.

*Results of the investigations in *Dendrocoelum lacteum**

In order to make a comparison, both enzyme reactions were performed in specimens of *Dendrocoelum lacteum* too. Strikingly enough, neither of them could be valued as positive in the central nervous system at places of the neuro-muscular junctions, in spite of the fact that the reactions have been repeated several times, in the same conditions, using — as controls — preparations of *Dugesia lugubris* parallelly treated.

### Discussion

One of the aims of our investigations was searching for such nerve-staining methods which are elective as far as possible, without being too complicated and lengthy. It was found that staining with hematoxylin, or strongly-diluted basic stains, after a foregoing steep in ammonium-molybdate can detect the nerve structures much better than the staining methods commonly used, moreover, the former may almost be regarded as elective. This can without doubt be attributed to the general affinity of the neurofibrils to the molybdate-ions [14]. The good results attained by using MALLORY staining can be interpreted similarly, while the nerve-staining capacity of the GIEMSA method may be due, in all probability, to its methylene-blue component. All these staining methods produce the best results if used after ZENKER fixation, metal-ions of which play probably some role in staining the nerve elements. A new method, published by BETCHAKU [2], which seems to be very well suitable for the demonstration of planarian nerve structures, can similarly be explained by this affinity to the metal-ions.

According to our observations, certain histochemical reactions, in our case the demonstration of alkaline phosphatase *e. g.*, might well be suitable for elective detection and, consequently, for morphological examination of the planarian nervous system. But a much more interesting problem is to interpret functionally the alkaline phosphatase activity. From this point of view, the fact is of importance that alkaline phosphatase activity of the nerve structures was found both in invertebrate and vertebrate species [13, 4, 9, 5]. Although the available data in this respect are insufficient to make more extensive comparisons, it may be supposed, nevertheless, that the alkaline phosphatases are of general importance for the nerve functions.

Data concerning alkaline phosphatase activity of the planarian nervous system and pharynx have first been published by YAMAMOTO [20]. His investigations were made on a *Dendrocoelopsis sp.* with the GÖMÖRI method. Positive reaction was found by him in the region of the head ganglion only and he did not publish data concerning the localization of the enzyme. According to YAMAMOTO, the difference between the head ganglion and other parts of the central nervous system, regarding the alkaline phosphatase activity, should be attributed to certain physiological differences existing between the head ganglion and the ventral nerve trunks, for example. It is worth mentioning, however, that the periods of incubation seem to be too long in YAMAMOTO's examinations, therefore his results concerning the more precise localization of the enzyme activity cannot be quite reliable. As stated above, in our examinations in which we used the prescribed method and incubation periods and which were carried out on *Dendrocoelum lacteum*, closely related to the *Dendrocoelopsis* genus and similarly albino, we could not find any posi-

tive reaction for alkaline phosphatase. We should like to underline, furthermore, that the specificity of the enzyme reaction was controlled, in our investigations, by using the azo dye method of MENTEN, JUNGE and GREEN too. As to *Dendrocoelum lacteum*, both methods delivered negative results.

The literary data as well as our own observation on *Dugesia lugubris* have consonantly shown alkaline phosphatase activity to be localized primarily in the nerve fibers and nerve-endings. The functional significance of this fact is not yet clear. The phosphatases might play some role, as it is supposed by BOURNE [4], in the synaptic transfer of the nerve impulses. After having found a very strong alkaline phosphatase activity in the motor nerve fibers and nerve-endings, respectively, we conclude that these enzymes must have an important role also in the neuro-muscular transfer of the nerve impulses. Since the sensory nerve fibers and nerve-endings gave no reactions of similar intensity, this histochemical method seems to be serviceable in distinguishing motory and sensory nerve fibers as well as nerve-endings of the planarians.

On the subject of the presence of specific cholinesterase in planarians, only one literary datum is known: ADAMS and THOMPSON [1] have found, by using a biochemical method, specific cholinesterase in a planarian species. They stated that the substratum-specificity of this enzyme is similar to that of the same mammalian enzyme, but it has a relatively higher resistance to the eserine-inhibition. Activity for specific cholinesterase has been found, in our own examinations, with a localization corresponding to the motor nerve-endings. Remarkably, at places of the motor innervation of the pharynx we could not observe any positive reaction. The musculature of the pharynx must be, functionally at least, regarded as a visceral one, the functioning of which is directly related to nutrition. Its innervation shows, both morphologically and functionally, specific characters differing from those of the somatic musculature. It looks possible that these functional characters can be expressed already on that primitive level of organization in biochemical differences of the neuro-muscular junction too.

In our preparations made from *Dendrocoelum lacteum*, cholinesterase activity could not be observed either. We think it probable that these enzymes are not absent at all from *Dendrocoelum lacteum*, but their concentration or activity is reduced in comparison with *Dugesia lugubris*. In connection with this fact, no far-reaching conclusions may be drawn as yet, nevertheless, one important fact should be, in our opinion, pondered for the time being. As it is known, the two planarian species studied by us differ not only in various morphological and physiological characters but in regenerative capacity too. As to the latter difference, *Dendrocoelum lacteum* is not capable, in contrast to *Dugesia lugubris*, of head regeneration at regions behind the pharynx. This phenomenon has no satisfactory explanation either in this case or in those of other planarian species. Histological examinations of regenerating *Dendro-*

*coelum lacteum* have shown that the failure of head regeneration is directly caused by the lacking regeneration of the nervous system and not by the absence of blastema-formation (*i. e.* absence of the neoblasts). As to the number of the nerve cells, no significant difference was found between the two species. Further on, supposing that the morphogenetic activity of the old nerve cells must play an important role in starting the nerve-regeneration [16], one may think the nerve cells of the two species are differing in their biochemical and physiological properties. In our opinion, this hypothesis is supported by the fact that there exist significant differences in enzyme activities between the nervous systems of the two species. Further verification of this hypothesis needs, naturally, subsequent histochemical examinations involving the study of enzymes localized in the nuclei and the cytoplasm of the nerve cells.

#### LITERATURE

1. ADAMS, T. H., THOMPSON, R. H. S. (1948) *Biochem. J.*, **42**, 170.
2. BETCHAKU, T. (1960) A copper sulfate—silver nitrate method for nerve fibers of planarians. *Stain Technology*, **35**, 215—218.
3. BONDI, C. (1959) Osservazioni sui rapporti tra rigenerazione degli occhi e sistema nervoso in *Dugesia lugubris*. *Arch. Zool. Ital.*, **44**, 141—150.
4. BOURNE, G. H. (1958) Histochemical demonstration of phosphatases in the central nervous system of the rat. *Exp. Cell Res., Suppl.* **5**, 101—117.
5. DOMJÁN, GY., MINKER, E. (1960) Untersuchung der Phosphomonoesterasen in den zentralen Nervenganglien der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*). *Acta Biol. Hung.*, **11**, 219—229.
6. GAZSÓ, L. R., TÖRÖK, L. J., RAPPAY, G. (1959) Histological and histochemical studies on the nervous system of *Dugesia lugubris* (O. SCHM.) (Turbellaria). *Acta Biol. Hung., Suppl.*, **3**, 46—47.
7. GELEI J. (1912) Tanulmányok a *Dendrocoelum lacteum* (OERSTD.) szövettanáról. Studies on the histology of *Dendrocoelum lacetum* (OERSTD.). Budapest. (In Hungarian.)
8. JIJIMA, J. (1884) Untersuchungen über den Bau und die Entwicklungsgeschichte der Süßwasser-Dendrocoelen (Tricladen). *Z. wiss. Zool.*, **4**, 359—464.
9. JUNQUEIRA, L. C. U., TAFURI, W. L., TAFURI, C. P. (1958) Quantitative and cytochemical studies on the intestinal plexus of the guinea pig. *Exp. Cell. Res., Suppl.*, **5**, 568—572.
10. LENDER, TH. (1952) Le rôle inducteur du cerveau dans la régénération des yeux d'une Planaire d'eau douce. *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, **36**, 140—215.
11. LENDER, TH. (1956) Analyse des phénomènes d'induction et d'inhibition dans la régénération des Planaires. *Ann. Biol.*, **32**, 457—471.
12. MICOLETZKY, H. (1907) Zur Kenntnis des Nerven- und Excretionssystems einiger Süßwasser-Tricladen, nebst andern Beiträgen zur Anatomie von *Planaria alpina*. *Z. wiss. Zool.*, **87**, 382—434.
13. Португалов, В. В. (1955) Очерки гистофизиологии нервных окончаний. Медгиз. МОСКВА.
14. ROMEIS, B. (1948) Mikroskopische Technik. 15. Auflage. München. Leibniz Verlag.
15. RÖHLMICH, P., TÖRÖK, L. J. (1961) Electron microscopical studies on the muscle cells and motor nerve fibers of planarians. (In prep.)
16. TÖRÖK, L. J. (1958) Experimental contributions to the regenerative capacity of *Dugesia* (= *Euplanaria*) *lugubris* (O. SCHM.). *Acta Biol. Hung.*, **9**, 79—98.
17. TÖRÖK, L. J. (1958) Az idegrendszer szerepének kísérletes vizsgálata a *Dugesia lugubris* regenerációjában. Experimental studies of the role of the nervous system in the regeneration of *Dugesia lugubris*. Thesis, Budapest. (In Hungarian.)
18. UDE, J. (1908) Beiträge zur Anatomie und Histologie der Süßwassertricladen. *Z. wiss. Zool.*, **89**, 308—370.

19. WOLFF, E., LENDER, TH. (1950) Sur le rôle organisateur du cerveau dans la régénération des yeux chez une Planaire d'eau douce. *C. R. Acad. Sci.*, **23**, 2238—2239.
20. YAMAMOTO, T. S. (1957) Histochemistry of the fresh water planarian *Dendrocoelopsis* sp. *Annotat. Zool. Jap.*, **3**, 150—155.

## CONTRIBUTIONS À L'HISTOCHIMIE DU SYSTÈME NERVEUX DES PLANAIRES

Dans la part méthodique de leurs examinatons, les auteurs ont cherché de telles méthodes de coloration qui sont aptes à colorer des éléments nerveux des planaires d'une électivité suffisante et qui ne sont pas, tout de même, trop compliquées et longues. Ils ont constaté que la coloration molybdate-hématoxyline d'après HANSEN, en outre celle d'après MALLORY et GIEMSA sont les plus aptes, entre les méthodes de coloration bien connues, pour colorer intensivement les fibres et les terminaisons nerveuses, mais pas d'une électivité désirale. Une intensive et presque élective coloration des éléments nerveux peut-on atteindre sur les sections en utilisant un mordançage à une solution de molybdate d'ammonium à 4%, puis une coloration avec une solution de thionine d'une concentration très basse, ou avec d'autres colorants basiques. Pour toutes ces méthodes de coloration, la fixation ZENKER s'est montrée comme la plus apte. L'investigation histo chimique des enzymes a été fait, d'une part, pour trouver quelques méthodes histo chimiques pouvant faciliter l'étude morphologique des éléments nerveux, de plus, pour en trouver telles qui sont aptes, d'autre part, à la démonstration de leur conditions fonctionnelles. Sur deux espèces de planaire d'eau douce (*Dugesia lugubris* et *Dendrocoelum lacteum*), il a été examiné l'activité de la phosphatase alcaline et de la cholinesterase du système nerveux en utilisant les méthodes de GÖMÖRI et de MENTEN—JUNGE—GREEN, respectivement celle de KOELLE—FRIEDENWALD. Ce qui concerne l'espèce *Dugesia lugubris*, on a trouvé une réaction positive de phosphatase alcaline à toutes les régions du système nerveux central avec une localisation sur les membranes nucléaires, les nucléoles et les fibrilles des cellules nerveuses. Une positive réaction a été démontré aussi aux fibres nerveuses motrices établissant les jonctions neuro-musculaires. Leur réaction s'est montrée beaucoup plus intense comme celle des fibres nerveuses centrales. Les préparations faites par la méthode de GÖMÖRI sont appropriées pour l'étude morphologique des éléments nerveux, aussi bien que pour faire une distinction entre les fibres nerveuses motrices et sensoriales, respectivement entre leurs terminaisons. Les auteurs supposent que la phosphatase alcaline joue un rôle important dans la transmission neuro-musculaire de l'influx nerveux. Ce qui concerne la cholinestérase spécifique, une positive réaction pouvait être démontrée dans la région de la jonction neuro-musculaire d'une localisation sur les terminaisons nerveuses motrices. L'absence remarquable d'une réaction positive de cholin estérase au pharynx peut être interprété, selon l'opinion des auteurs, par les différences morphologiques et physiologiques existant entre l'innervation de la musculature somatique et viscérale. Dans l'organisme de *Dendrocoelum lacteum*, les auteurs ne pouvaient point démontrer, surprenant assez, une positive réaction ni pour la phosphatase alcaline, ni pour la cholinestérase. En considérant ce fait, de plus certaines résultats de leurs investigations effectuées dans d'autres directions, les auteurs supposent que le pouvoir régénérant beaucoup plus faible de cette espèce, étant comparé avec celui de *Dugesia lugubris*, doit être en relation avec des différences biochimiques et physiologiques existant entre les cellules nerveuses du système nerveux central des deux espèces.

## ДАННЫЕ К ГИСТОХИМИИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПЛАНАРИЙ

Авторы, в методической части работы, разыскали методы окрашивания, которые элективно крашут нервные элементы, простые и не длительные. Нашли, что в этом отношении наилучшие молибдатгематоксилин Ганзена, Маллори и Гимза—Романовского, которые интенсивнее красили нервные элементы, чем другие, правда не достаточно элективно. В срезах хорошее и почти элективное окрашивание нервных элементов получается если предварительно срез плюсуется 4 процентным раствором аммоний-молибдата и после этого красится сильно разведенным раствором тионина (или другими основными красками). Для этих окрашиваний материалы лучше всего фиксировать в жидкости Ценкера. Гистохимические исследования энзимов проводились с той целью, чтобы найти методы самые пригодные для исследования структур и функциональных состояний нервных элементов. На двух пресноводных видах (*Dugesia lugubris* и *Dendrocoelum lacteum*)

проводились исследования реакции основной фосфатазы по Гёмёри и Ментен—Юнг—Грин и активность холинестеразы по Келле—Фридленвальд. Позитивная реакция основной фосфатазы получилась по всей центральной нервной системе, которая локализована в оболочке ядер, ядрышке и нейрофибрillах нервных клеток, кроме того в окончаниях двигательных невронов. В этих окончаниях реакция больше выражена чем в центральных волокнах. Картинны, полученные по методике Гёмёри, пригодны для изучения структур нервных элементов, а также для дифференциации двигательных и чувствительных волокон и окончаний. По предложению авторов, основная фосфатаза при передачи нейро-мускулярной возбуждения играет большую роль. Положительную реакцию холинестеразы находили, только в соматической нейро-мускулярной связи, которая локализовалась в моторных окончаниях. По мнению авторов, отсутствие положительных реакций в глотке можно объяснить разницей морфологической и физиологической особенности иннервации соматической и висцеральной мускулатуры. Убедительно, что у *Dendrocoelum lacteum* не находили положительной реакции основной фосфатазы и холинестеразы. По авторам этот факт (и другие) говорят о том, что меньшая способность к регенерации у *Dendrocoelum lacteum*, по сравнению с *Dugesia lugubris*, объясняется биохимической и физиологической разницей центральной нервной системы этих двух видов.

LENKE R. GAZSÓ, Budapest IX, Tűzoltó u. 58. Hungary

LÁSZLÓ J. TÖRÖK, Budapest IX, Tűzoltó u. 58. Hungary

GYÖRGY RAPPAY, Budapest IX, Tűzoltó u. 58. Hungary

The *Acta Biologica* publish papers on biological subjects in English, German, French and Russian.

The *Acta Biologica* appear in parts of varying size, making up volumes.

Manuscripts should be addressed to:

*Acta Biologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.*

Correspondence with the editors and publishers should be sent to the same address.

The rate of subscription to the *Acta Biologica* is 110 forints a volume. Orders may be placed with "Kultura" Foreign Trade Company for Books and Newspapers (Budapest, I., Fő utca 32. Account No. 43-790-057-181) or with representatives abroad.

---

Les *Acta Biologica* paraissent en français, allemand, anglais et russe et publient des travaux du domaine des sciences biologiques.

Les *Acta Biologica* sont publiés sous forme de fascicules qui seront réunis en volumes. On est prié d'envoyer les manuscrits destinés à la rédaction à l'adresse suivante:

*Acta Biologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.*

Toute correspondance doit être envoyée à cette même adresse.

Le prix de l'abonnement est de 110 forints par volume.

On peut s'abonner à l'Entreprise pour le Commerce Extérieur de Livres et Journaux «Kultura» (Budapest I., Fő utca 32. Compte-courant No. 43-790-057-181) ou à l'étranger chez tous les représentants ou dépositaires.

---

«*Acta Biologica*» публикуют трактаты из области биологии на русском, немецком, английском и французском языках.

«*Acta Biologica*» выходят отдельными выпусками разного объема. Несколько выпусков составляют один том.

Предназначенные для публикации рукописи следует направлять по адресу:

*Acta Biologica, Budapest IX., Tűzoltó u. 58.*

По этому же адресу направлять всякую корреспонденцию для редакции и администрации.

Подписная цена «*Acta Biologica*» — 110 форинтов за том. Заказы принимает предприятие по внешней торговле книг и газет «Kultura» (Budapest I., Fő utca 32. Текущий счет 43-790-057-181) или его заграничные представительства и уполномоченные.

**INDEX**

- OLÁH, E.—HADHÁZY, Cs.—KOSTENSKY, K.: Untersuchungen über die Knorpelbildung.  
IV. Das Gewebsatmungsvermögen der regenerierenden Gelenkfläche in den ver-  
schiedenen Regenerationsstadien ..... 295
- KOROTKOVA, G. P.: Regeneration and somatic embryogenesis in the calcareous sponge  
*Leucosolenia complicata* MENT. ..... 315
- KORMOS, J.—KORMOS, K.: Phylogenetische Wertung konvergenter und divergenter  
Eigenschaften bei den Suktorien ..... 335
- KÁRPÁTI, V.—KÁRPÁTI, I.: Winter dormancy of Hungarian trees and shrubs. I. Trees  
and shrubs of natural groves ..... 359
- ZADOR, S.: Effect of temperature on the redox potential in bacterial cultures ..... 387
- SZABÓ, K.: The changes of the bound amino acid composition of the shoot apex — devel-  
oping into male inflorescence — of maize, during differentiation ..... 393
- NÉMETH, G.—CSIK, L.: Effect of penicillin on *Tetrahymena pyriformis*, strain Gl. I. Multi-  
plication and change of form ..... 405
- GAZSÓ, L. R., TÖRÖK, L. J.—RAPPAY, Gy.: Contributions to the histochemistry of the  
nervous system of planarians ..... 411