

10 days, the plantlets were well developed with a normal morphological structure of both leaves and roots. The plant growth was considerably influenced by the carbon source (Table I).

The best growth was obtained with fructose, glucose or sucrose as a carbon source; with all other carbohydrates, the growth was much poorer. With maltose, raffinose and inulin, leaf growth rate was higher than root growth rate; galactose and lactose inhibited growth almost completely.

Table I

Carbon source	Leaf Mean length (mm)	Root Mean length (mm)	Ratio leaf length/ root length $\times 100$
Control (no sugar)	0	0	—
Glucose	9.38 ± 1.55	27.13 ± 3.9	34
Fructose	15.23 ± 1.22	31.49 ± 2.5	48
Saccharose	10.00 ± 0.94	14.62 ± 1.26	68
Maltose	5.7 ± 0.7	2.00 ± 0.26	285
Lactose	1.37 ± 0.25	0.54 ± 0.1	25
Galactose	0.21 ± 0.17	0.00	—
Raffinose	5.00 ± 0.45	1.53 ± 0.19	326
Xylose	2.4 ± 0.47	2.4 ± 0.38	100
Dulcitol	0.0	0.0	—
Inulin	0.97 ± 0.53	3.27 ± 0.24	151

F value (leaf, significance level 1%): observed, 25.67; theoretical, 2.18.
F value (root, significance level 1%): observed 4.37; theoretical, 2.51.

Table II. Effect of light on the growth of wheat plantlets in submerged 10-day culture

Culture conditions ^a	Leaf Mean length (mm)		Root Mean length (mm)	<i>t</i>
Dark	10 ± 0.94	3.8	14.62 ± 1.26	0.05
Light	15.9 ± 1.2	$P > 0.01$	14.63 ± 1.5	$P < 0.05$

^a Sucrose was the carbon source.

The maximum dry weight of a whole single plant obtained with fructose as the carbon source was 13 mg and the total plant dry weight per flask was about 130 mg.

Wheat embryos were also cultured in fluorescent light (3000 lumens) under the same conditions as in the dark. The main difference was noted in the mean leaf length; the mean root length was not significantly influenced by light (Table II).

Similar results have been obtained by growing other graminaceous plants such as rye and barley, or plants such as *Ipomoea rubrocaerulea* and *Digitalis purpurea* in submerged culture with sucrose as carbon source.

Plant growth under the conditions described was found to be dependent on the continuous agitation of the flasks, i.e. on the continuous aeration of the liquid culture medium. Under stationary conditions, the embryos did not even start germinating. This type of plant growth in a submerged shaken culture, such as that used for growing bacteria, streptomycetes, and fungi, is obviously quite different from soil-less culture. In the latter, roots only are in contact with the medium nutrients, whereas in submerged shaken culture both roots and leaves are in close contact with the liquid medium. In nature, only the growth of aquatic plants, in particular only those whose leaves are submerged in water, resembles the submerged culture of plants described above.

Riassunto. Viene descritto un metodo per la coltura sommersa sterile di piantine intere di graminacee, di *Ipomoea* sp. e di *Digitalis* sp. È stata studiata l'influenza dei vari zuccheri sulla crescita delle foglie e della radice. È stato trovato che le piantine crescono rapidamente in presenza di glucosio, fruttosio e saccarosio, mentre sono inibite in varia misura da altri zuccheri. L'influenza della luce sulla crescita si manifesta solo sul culmo e sulle foglie e non sulle radici. L'aereazione è un fattore determinante sulla crescita: in assenza di agitazione l'embrione non germina e le piantine non crescono.

L. BARCELLONA-VERO, L. MINO,
N. ODDO, P. REALI-TEMPESTA
and A. TONOLO

Department of Biochemistry, Istituto Superiore di Sanità,
Roma (Italy), 1 July 1968.

Methode zur kontinuierlichen Registrierung der Atembewegungen am freibeweglichen Krebs (*Potamobius astacus* Leach)

Die Atembewegungen, d.h. das Schlagen der Scaphognathiten, in den Kiemenräumen des Krebses konnten bislang nur durch Beobachten und Zählen bei eröffnetem Carapax, durch Hebel-Schreiber-Anordnungen oder mittels mechanisch-elektrischer Umformer indirekt oder direkt gemessen werden. Diese Methoden beinhalten Fehlerquellen, von denen hier nur die Trägheit der Messsysteme und die veränderten Strömungsverhältnisse bei geöffnetem Panzer erwähnt seien. Zudem musste das Tier während des Versuches festgeschnallt sein.

Bei einer Untersuchung über die Koordination und Steuerung der Scaphognathitenbewegung beim Flusskrebis wird hier eine Methode verwendet, die es erlaubt, die Schläge beider Scaphognathiten kontinuierlich und nahezu ohne mechanische Belastung am (wieder) geschlossenen Kiemenraum bei relativ freier Beweglichkeit

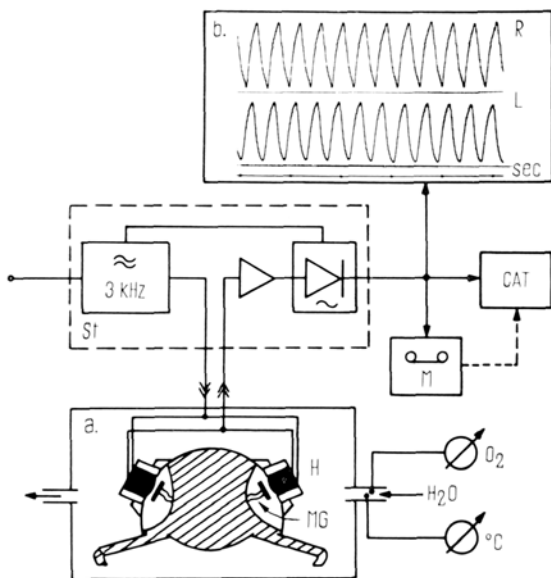
des Tieres aufzuzeichnen. Ausgenutzt wird der Hall-Effekt, mit dem sich Veränderungen eines magnetischen Feldes messen lassen^{1,2}. Dieses Feld stammt von einem auf dem Scaphognathiten befestigten Magneten (Krupp Koerflex 300, Durchmesser 0,3 mm, Länge ca. 2,5 mm, Gewicht 1,5–1,8 mg) und wird mit einem Hall-Generator (Siemens Axialfeldsonde RHY 11) registriert.

In dem Carapaxbereich über dem Scaphognathiten wird dem Krebs ein Loch von 5 mm Durchmesser durch den Panzer geätzt und der Magnet mit einer Platindrahtschlinge an der Gliedmasse befestigt. Eine über der

¹ H. WEISS, Solid-St. Electron. 7, 279 (1964).

² G. HENNIG, Elektronik 8, 225 (1965).

Öffnung mit Bienenwachs-Kolophonium (Mischung 1:3) befestigte Fassung nimmt den Hall-Generator auf, der zur Justierung in einem Paßstück sitzt (Figur a). Wird der den Magneten tragende Scaphognathit bewegt, so erfasst die Sonde die Veränderungen des Feldes. Die Messwerte gelangen über ein Steuergerät³ zu den Registereinheiten (Figur, Blockschaltbild). Während des Versuches sitzt der freibewegliche Krebs in einem durch-



Blockschaltbild der Versuchsanordnung. ST, Steuergerät; M, Magnetbandgerät; CAT, Computer. (a) Tier im Versuchsgefäß. MG, Magnet am Scaphognathit; H, Hall-Generator. (b) Aufzeichnung der Scaphognathitenbewegung am Schreiber. R, rechte Seite; L, linke Seite; sec, Zeitmarke.

strömten Plexiglasbecken ($30 \times 30 \times 12$ cm), das mit einem Deckel luftdicht verschlossen ist. Lediglich die dünnen Drähte verbinden das Tier mit den Anschlussbuchsen im Deckel des Gefäßes.

Mit dieser Methode ist es möglich, die Bewegungen der beiden Scaphognathiten simultan zu messen und Schlagrichtung, Frequenz und Amplitude quantitativ über einen längeren Zeitraum zu erfassen (Figur b). Zur Auswertung der Phasenbeziehungen und anderer Größen, die für eine Analyse der Koordination von Bedeutung sind, werden die Messdaten direkt oder über ein Magnetband einem Computer (CAT 400 C) zugeführt und ausgewertet. Simultan mit der Atembewegung werden Wassertemperatur und Sauerstoffgehalt im Versuchsgefäß mitgemessen.

Ergänzend sei bemerkt, dass diese Methode mit geringfügigen Veränderungen zur Registrierung von vielen rhythmischen und arrhythmischen – insbesondere schnellen – Bewegungen an freibeweglichen Tieren eingesetzt werden kann.

Summary. A recording method for the ventilation movement by means of the Hall-effect in the unrestrained crayfish is described. Frequency, amplitude and direction of movement can be measured quantitatively by this method which may be applicable also to other physiological preparations.

M. NAYNERT⁴

Zoologisches Institut der Universität,
Lehrstuhl für Tierphysiologie,
5 Köln-Lindenthal (Deutschland),
16. Mai 1968.

³ Das Steuergerät wurde von Herrn Ing. SCHÖNEMANN konstruiert, dem hierfür gedankt sei.

⁴ Mit dankenswerter Unterstützung durch Mittel, die die Stiftung Volkswagenwerk Herrn Prof. Dr. HUBER zur Verfügung stellte.

Application of the Indigogenic Principle for the Histochemical Demonstration of Ribonuclease

Recent studies in this laboratory have led to the histochemical demonstration of both acid and alkaline phosphomonoesterase¹ (orthophosphoric monoester phosphohydrolase) through the use of the synthetic substrate *p*-toluidinium 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate². Enzymatic hydrolysis of this substrate liberates 5-bromo-4-chloroindol-3-ol, which is rapidly and irreversibly oxidized to 5,5'-dibromo-4,4'-dichloroindigo at the sites of activity.

On the basis of these findings, efforts were directed to the application of the indigogenic principle to the histochemical localization of phosphodiesterases I and II³. The syntheses, which were modeled after those described by RAZZELL and KHORANA⁴ for nitrophenyl-pT and Tp-nitrophenyl, proceeded from 1-acetyl-5-bromo-4-chloroindol-3-ol to give 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-pT and Tp-5-bromo-4-chloro-3-indolyl in moderate yields. It was desirable to extend the indigogenic principle for the histochemical demonstration of ribonuclease since a majority of present techniques to demonstrate this enzyme are indirect coupling procedures or fluorescent antibody techniques⁵⁻⁷. The most recent coupling procedure involved the use of uridine 2':3' naphthyl phosphate⁸. A

specific substrate for ribonuclease, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-uridine 2' (3') phosphate was synthesized in our laboratory modeled after the technique for the indolyl substrates for phosphodiesterases 1 and 11³. This substrate offers the advantage of precise enzyme localization with no or very slight diffusion. Moreover, the substrate affords a simple and direct method for demonstration of this enzyme without the need for a coupling reaction.

¹ P. L. WOLF, J. P. HORWITZ, J. VAZQUEZ, J. CHUA, M. S. Y. PAK and E. VON DER MUEHLL, *Experientia* 23, 183 (1967).

² J. P. HORWITZ, J. CHUA, M. NOEL, J. T. DONATTI and J. FREISLER, *J. Med. Chem.* 9, 447 (1966).

³ P. L. WOLF, J. P. HORWITZ, J. V. FREISLER, J. VAZQUEZ and E. VON DER MUEHLL, *Biochim. Biophys. Acta* 159, 212 (1968).

⁴ W. E. RAZZELL and H. G. KHORANA, *J. biol. Chem.* 234, 2105 (1959).

⁵ O. S. ATWAL, J. B. ENRIGHT and F. L. FRYE, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 115, 744 (1964).

⁶ R. DAoust and H. AMANO, *J. Histochem. Cytochem.* 8, 131 (1960).

⁷ A. H. COONS and M. H. KAPLAN, *J. exp. Med.* 97, 1 (1950).

⁸ M. ZAN-KOWALCZEWSKA, H. SIERAKOWSKA and D. SHUGAR, *Acta biochim. pol.* 13, 1 (1966).