

Effect of abscisic acid on the photosynthetic rate of isolated mesophyll protoplasts from *Petunia hybrida*

Time ABA acting (h)	Concentration of ABA (racemate)				
	1 ppm 3.8 $\mu M/l$	5 ppm 19 $\mu M/l$	10 ppm 38 $\mu M/l$	50 ppm 190 $\mu M/l$	200 ppm 760 $\mu M/l$
1	100 \pm 4.5	100 \pm 4.5	100 \pm 4.5	—	—
2	100 \pm 4.5	100 \pm 4.5	104 \pm 4.5	131 \pm 3.0	—
3	100 \pm 4.5	103 \pm 4.5	123 \pm 3.0	198 \pm 3.0	116 \pm 3.0

Controls = 100%.

The mesophyll protoplasts from *Petunia hybrida* were produced by methods already described^{8, 10}. In scintillator vials 10⁶ protoplasts in 1 ml medium (0.4 M mannitol/0.23 M NaHCO₃, ratio 95:5; with 0.22 M HCl brought to pH 7.2) were incubated with ABA (racemate) of different concentrations (Table) for different times (1–3 h). Then 2 μ Ci of NaH¹⁴CO₃ in 100 μ l 0.4 M mannitol were added and the probes were illuminated for exactly 10 min in an illuminated thermostat (8 \times 40 W Osram-L-Warmton lamps, ca. 9000 lux, temperature 24°C). After this, hot ethanol was added and the vials boiled for 2 min. After transferring into 50 ml graduated vessels and filling with 60% ethanol, the liquid was boiled again for 30 min, then the vessels filled up with ethanol. The activity of an equivalent of this final solution was measured in the scintillation counter in dioxane cocktail (gain 83%). Since ABA must be brought in solution with a few droplets of ammonia, the concentration of the latter rises with increasing concentration of the hormone. Therefore the respective concentrations of NH₃ were established in the controls. Always after addition of ABA or – in the controls – of NH₃ alone, the pH was adjusted again to 7.2. Due to the rising quantities of NH₃, the absolute rates of photosynthesis, measured as amount of ¹⁴CO₂ fixed, are not comparable; in the controls they decline. (In 1 set of control experiments without any NH₃ added, the rate is 2.98 $\mu M CO_2$ /mg chlorophyll in 10 min; this is in good agreement with our earlier findings). Therefore the results are given as percentage of the photosynthetic rate of the respective controls. Each experiment was done 3 times together with 3 controls.

The results are shown in the Table. A rise of the photosynthetic rate caused by ABA can be seen. A marked effect needs relatively high concentrations of ABA with respect to naked protoplasts. With $1.9 \times 10^{-4} M/l$ ABA after 3 h the increase of the photosynthesis reaches nearly 100%; with $7.6 \times 10^{-4} M/l$ the effect is considerably lower, probably due to an inhibitory effect of very high concentrations of the phytohormone.

To a certain extent the results are surprising, considering that ABA is a senescence-promoting hormone^{11, 12}. The concentrations of ABA which cause a rise of the photosynthetic rate of mesophyll protoplasts are a great deal higher than those needed for closure of stomata and the subsequent inhibition of photosynthesis of

leaves⁶. Therefore an unspecific effect of ABA cannot be fully excluded. The results show the effects of a phytohormone on isolated cells in this case to be different from those on the whole leaf as a target. Under normal physiological conditions ABA is effective in whole tissues, so in evolution the function of the phytohormone was determined by selection in respect to the whole system and not to single cells. We think the results are explained best, in agreement with the findings of some other authors, as an effect of ABA on membrane permeability^{4, 13}, or the activity of ion uptake^{4, 14–16}. The reported⁸ reduction of the activity of ribulosediphosphate carboxylase activity is due to an inhibition of plastid development and is not contrary to our findings with 'adult' cells¹⁷.

Zusammenfassung. Inkubation mit Abscisinsäure verursacht bei Mesophyll-Protoplasten von *Petunia hybrida* einen Anstieg der Photosyntheserate.

F. HOFFMANN¹⁸ and U. KULL

Lehrstuhl für Botanische Entwicklungsphysiologie, Universität Hohenheim, Emil-Wolff-Strasse, D-7000 Stuttgart 70, and Biologisches Institut der Universität Stuttgart, Ulmer Strasse 227, D-7000 Stuttgart 60 (Federal Republic of Germany).
11 February 1974.

¹ I. POTRYKUS and J. DURAND, *Nature New Biol.* 237, 286 (1972).
¹⁰ F. HOFFMANN, *Z. Pflanzenphysiol.* 69, 249 (1973).

¹¹ F. T. ADDICOTT and J. L. LYON, *A. Rev. Plant Physiol.* 20, 139 (1969).

¹² B. V. MILBORROW, *Sci. Prog., Lond.* 57, 533 (1969).

¹³ Z. GLINKA and L. REINHOLD, *Plant Physiol.* 48, 103 (1971). – Z. GLINKA, *Plant Physiol.* 51, 217 (1973).

¹⁴ T. A. MANSFIELD and R. J. JONES, *Planta* 107, 147 (1971).

¹⁵ R. F. M. VAN STEVENINCK, *Z. Pflanzenphysiol.* 67, 282 (1972).

¹⁶ G. N. BROWN and C. Y. SUN, *Physiologia plant.* 28, 412 (1973).

¹⁷ This work was supported by the German Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft. We thank Prof. Dr. D. HESS for a helpful discussion, Mrs. A. KRAUS for technical assistance and Mr. P. CLEARY for correction of the English text.

¹⁸ New address: Max-Planck-Institut für Pflanzenphysiologie, D-6802 Ladenburg.

Der Einfluss der Aggression auf Lernen und Vergessen beim Kampffisch *Betta splendens* (Pisces, Anabantoidei)

Lern- und Behaltensprozesse werden stark von allem beeinflusst, was das lernende Individuum vor, während und nach dem Lernen tut und erlebt. Konsolidierung und Stabilität der Engramme sind offensichtlich am grössten,

wenn auf den Lernakt Perioden absoluter Passivität, etwa Schlaf, oder aber Ruheperioden folgen^{1–9}. Zwischen Lernen und Reproduzieren eingeschobene Aktivitäten scheinen dagegen den Vergessensvorgang zu beschleuni-

gen. Sie wirken im Sinne einer retroaktiven Hemmung. Wir wollten nun prüfen, in welcher Weise sich experimentell ausgelöstes Aggressionsverhalten auf Lernvorgänge und Behaltensdauer auswirkt.

Als geeignete Versuchstiere boten sich Kampffische (*Betta splendens*) an, bei denen jederzeit mit einfachsten Mitteln Aggressionsverhalten hervorgerufen werden kann.

Die Experimente erfolgten in zwei Versuchsserien mit insgesamt 40 Kampffisch- δ . In Versuch I wurde der Einfluss der Aggression auf Lernen und Behalten geprüft, in Versuch II nur auf das Behalten. Als Dressurmethode diente simultane straffreie Zweifachwahl mit Futterbelohnung am positiven Zeichen. Im Test waren beide Zeichen beködert. Dressiert wurde bei täglich 30 aufeinanderfolgenden Wahlen je Fisch (Dauer der Versuche etwa 15 min/Tier) auf die Unterscheidung von Rot gegen Blau. Der Dressur voran gingen Farbpräferenzprüfungen. Nach Erlernen der Aufgabe wurden Vergessenstests durchgeführt. Alle Tiere wurden bei einheitlicher künstlicher Beleuchtung (Licht-Dunkel-Wechsel 13:11 h) und einer Wassertemperatur von $27^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ in Einzelaquarien gehalten.

Versuch I. Bei 20 Fischen wurden die Spontantendenzen durch Dressur auf die jeweils bevorzugte Farbe verstärkt, bis alle Tiere fast 100% richtig wählten. Da-

durch erhielten wir eine einheitliche Ausgangsposition für die sich anschliessende Reversal-Dressur. Vor Beginn dieser Umdressur wurden die Tiere nach den ermittelten Spontantendenzen, nach Lerngeschwindigkeit bei der Vordressur und erreichtem Endniveau in 10 leistungsgleiche Paare eingeteilt, die aus je einem Versuchstier (Vt) und einem Kontrolltier (Kt) bestanden. In der dressurfreien Zeit des Tages, später, während der Vergessenstests, auch in der testfreien Zeit, wurden nun die Vt – nicht aber die Kt – durch Konfrontation mit einem Spiegel und durch den Anblick von Artgenossen in zwei benachbarten Aquarien gereizt, so dass jedes Vt am Spiegel und mit zwei Gegnern kämpfen konnte. Dadurch blieb die Kampfbereitschaft in den ersten 14 Tagen erhalten. Um dann einer langsam auftretenden Gewöhnung entgegenzuwirken, boten wir nach dieser Zeit Spiegel und Gegner nur noch an jedem 2. Tag, wodurch eine Reaktivierung der Kampfbereitschaft erreicht wurde. Die Umdressuren der Vt und Kt wurden abgeschlossen, wenn alle Tiere an 3 aufeinanderfolgenden Tagen bei je 30 Versuchen die Signifikanzgrenze vor 80%¹⁰ überschritten hatten. Danach schlossen sich Vergessenstests zunächst in Intervallen von 5 Tagen (2mal), dann von 10 Tagen an. Sie wurden bei jedem Paar beendet, wenn die Anzahl der Richtigwahlen eines Tieres zweimal hintereinander unter die Signifikanzgrenze gesunken war.

Mit Hilfe des X^2 -Tests (Anwendung der $m \times k$ -Tafel¹¹) wurde festgestellt, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit die Nullhypothese verworfen und damit der Unterschied der Richtigwahl-Anzahl zwischen Vt- und Kt-Gruppen als gesichert angesehen werden kann. Zusätzlich berechneten wir für jeden einzelnen Tag die Signifikanz des Unterschiedes zwischen den Werten der Vt und Kt mit Hilfe des t-Tests für den Paarvergleich¹².

Wie Figur 1 zeigt, wurde der Lernvorgang durch die Aggression merklich beeinflusst. Die Vt zeigten bei der Reversal-Dressur in den ersten 5 Tagen bessere Leistungen als die Kt (nach dem t-Test Werte des 1. bis 4. Tages mit $p < 0,03$ gesichert) und erreichten mit einem Vorsprung von einem Tag Lernwerte oberhalb der Signifikanzgrenze. Bei den Vt ist der weitere Lernzuwachs dann aber gering. Sie erreichen ein Lernplateau bei 27 Richtigwahlen von 30, während die Leistungen der Kt sich auf nahezu 30 Rw steigern. Vom 8. Dressurtag an zeigten die Vt nach dem t-Test signifikant schlechtere Lernleistungen als die Kt.

Das zunächst raschere Ansteigen der Lernkurve bei den Vt wird von uns dahingehend interpretiert, dass die Vt unter dem Einfluss der Aggression die zuerst erlernte Aufgabe schneller vergessen, so dass dadurch die Umkehrdressur erleichtert ist. Die stete Kampfaktivität wirkt sich später aber negativ auf die Lernsicherheit aus.

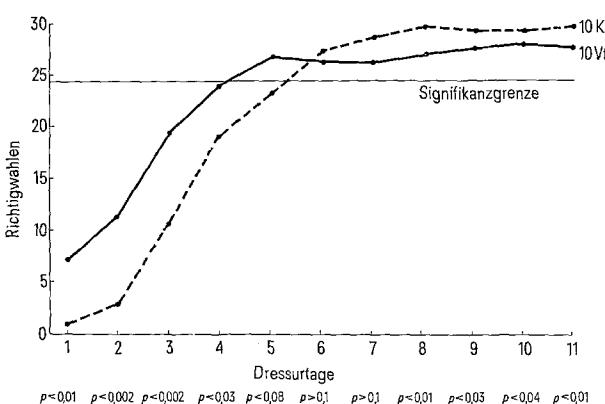


Fig. 1. Umdressur der Versuchsserie I.

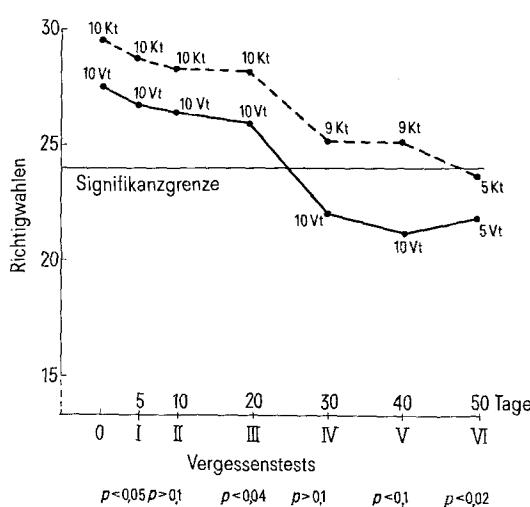


Fig. 2. Vergessenstests der Versuchsserie I. Bei 0: Ausgangswerte, gemittelt aus den drei letzten Werten der Umdressur.

- ¹ E. DAHL, Psychol. Forsch. 11, 291 (1929).
- ² E. B. VAN ORMER, Psychol. Bull. 30, 415 (1933).
- ³ E. A. GRAVES, J. exp. Psychol. 19, 316 (1936).
- ⁴ E. B. NEWMAN, Am. J. Psychol. 52, 65 (1939).
- ⁵ G. VIAUD, C. r. Soc. Biol., Paris 96, 553 (1945).
- ⁶ D. PLOOG, Nervenarzt 28, 277 (1957).
- ⁷ G. DÜCKER und B. RENSCH, Pflügers Arch. 301, 1 (1968).
- ⁸ L. MIHAJLOVIC, Nature, Lond. 278, 191 (1968).
- ⁹ M. C. McNAMARA und M. C. RIEDESEL, Science 179, 92 (1973).
- ¹⁰ S. KOLLER, Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen, 3. Aufl. (Steinkopff-Verlag, Darmstadt 1953).
- ¹¹ E. WEBER, Grundriss der biologischen Statistik, 6. Aufl. (Fischer-Verlag, Jena 1967), p. 496.
- ¹² R. C. CAMPBELL, Statistische Methoden für Biologie und Medizin (Thieme-Verlag, Stuttgart 1971).

Bei den anschliessenden Vergessenstests sanken die Leistungen der Vt schneller unter die Signifikanzgrenze (Figur 2). (Unterschiede zwischen Vt und Kt nur für den 1., 3. und 6. Vergessenstest nach dem *t*-Test gesichert, nach dem X^2 -Test alle Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%). Das darf zunächst einmal auf das niedrigere Lernniveau der Vt zurückgeführt werden. Ob die schlechtere Ausgangsposition der Vt zu Beginn der Vergessenstests allerdings allein das schnellere Vergessen bewirkte, ist fraglich. Von Einfluss kann zusätzlich auch die stete Kampfaktivität der Vt während der Vergessensphase gewesen sein. Eine eindeutige Aussage liess sich mit diesem Versuch nicht gewinnen.

Versuch II. Um den Einfluss der Aggression auf das Vergessen genauer zu untersuchen, wählten wir einen etwas abgewandelten Versuchsmodus. Gearbeitet wurde wieder mit 20 Kampffischen (von denen im Verlauf der Versuche einige starben). Alle Tiere dressierten wir jetzt sofort auf die nicht bevorzugte Farbe. Während der Lern-

phase blieben nun alle Fische ungereizt. Nach Erlernen der Aufgabe (Lernkriterium s. Versuch I) teilten wir die Tiere nach ermittelten Spontantendenzen, Lerngeschwindigkeit und erreichtem Lernniveau in leistungsgleiche Paare (Vt und Kt) ein. Anschliessend wurden nur die Vt für die ganze Dauer der Vergessensphase in der zuvor beschriebenen Weise aggressionspezifischen Reizen ausgesetzt. Die Kt blieben ungereizt. Die Vergessenstests führten wir in Abständen von 7 Tagen durch.

Wie Figur 3 zeigt, waren die in der Dressur erzielten Lernleistungen bei Vt und Kt nahezu gleich. Die Vt vergessen die erlernte Aufgabe aber schneller als die Kt. In allen Vergessenstests lagen die Durchschnittswerte der Vt unterhalb derjenigen der Kt. Alle Werte sind mit einer Ausnahme (4. Vergessenstest) nach dem *t*-Test gesichert (Figur 3). Nach dem X^2 -Test waren die Unterschiede zwischen Vt und Kt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% gesichert. Das schnellere Vergessen der Vt kann hier nur auf den Einfluss der Aggression zurückgeführt werden.

Das Wirksamwerden der Aggression auf die Lern- und Gedächtnisleistungen kann durch mehrere Faktoren bedingt sein: a) durch retroaktive Hemmung infolge der Kampfaktivität, b) durch eine mit dem Aggressionsverhalten auftretende zentralnervöse Erregung, c) durch eine infolge der Erregung und der aggressionspezifischen Aktivität auftretende Intensivierung des Stoffwechsels, die zu einem schnelleren Abbau von Engrammen führen kann.

Summary. *Betta splendens*-♂♂ were tested as to whether aggression-specific stimulation had any influence on learning and retention of a simple colour discrimination task. In comparison with control animals, the stimulated animals showed worse results in learning and retention.

G. DÜCKER, N. NUTTEBAUM und I. SCHULZE

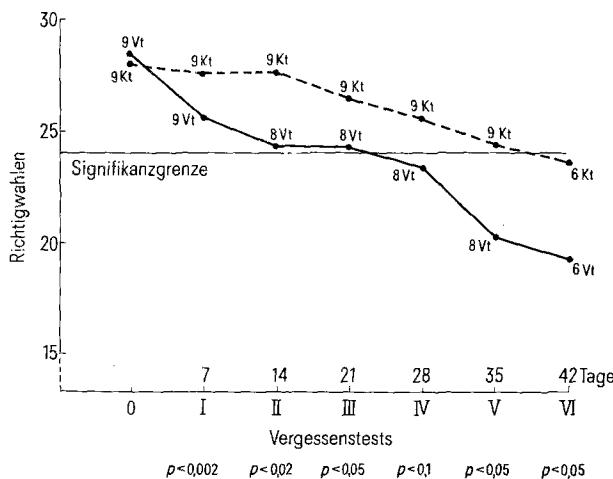


Fig. 3. Vergessenstests der Versuchsserie II. Bei 0: Ausgangswerte, gemittelt aus den drei letzten Werten der Dressur.

Mitotic Activity in Lemon Fruit Explants (*Citrus limon* L.) Incubated on a Calcium-Potassium-Sucrose Medium

Changes in nucleolar morphology and starch production have been considered as being early cytological and physiological indications of growth in lemon fruit explants cultured on a mineral-sucrose nutrient medium¹. Subsequent investigations have shown that these same cytological and physiological phenomena can be brought about by injury alone in complete isolation from any exogenous source of nutrient materials or growth-promoting substances²⁻⁵. Although lemon juice contains sugars, nitrogenous compounds, vitamins, and the six macroelements and most of the microelements known to be essential for plant growth^{6,7}, mitotic activity has not been described in lemon fruit explants incubated on anything less than basal mineral-sucrose nutrient media with or without growth-promoting substances⁸⁻¹². Thus all materials required for the manifestation of starch production and changes in nucleolar morphology are available from endogenous sources within the explants themselves whereas this is not the case with respect to the material requirements needed for the manifestation of mitotic activity (Figure 1).

Citric acid is the most abundant organic acid in lemon juice⁶ and is known to be a strong chelating agent for Ca¹⁴. The occurrence of Ca and K in lemons in combination

- ¹ H. A. KORDAN, Bull. Torrey Bot. Club 92, 21 (1965).
- ² H. A. KORDAN, Experientia 25, 517 (1969).
- ³ H. A. KORDAN, Z. Pflanzenphysiol. 67, 311 (1972).
- ⁴ H. A. KORDAN, Phytochemistry 11, 2743 (1972).
- ⁵ H. A. KORDAN, Ann. Bot., in press.
- ⁶ S. V. TING and J. A. ATTAWAY, *The Biochemistry of Fruits and Their Products* (Ed. A. C. HULME; Academic Press, London and New York 1971), vol. 2, p. 107.
- ⁷ H. A. KORDAN and J. DALE, Z. Pflanzenphysiol. 69, 456 (1973).
- ⁸ H. A. KORDAN, Science 129, 779 (1959).
- ⁹ H. A. KORDAN, Bull. Torrey Bot. Club 89, 49 (1962).
- ¹⁰ H. A. KORDAN, Phytomorphology 20, 413 (1970).
- ¹¹ J. P. NITSCH, Bull. Soc. bot. fr. 112, 19 (1965).
- ¹² D. P. H. TUCKER, Dissertation Abst. 27, 3728-B (1967).
- ¹³ T. R. MURASHIGE, R. NAKANO and D. P. H. TUCKER, Phytomorphology 17, 469 (1967).
- ¹⁴ C. CHABEREK and A. E. MARTELL, *Organic Sequestering Agents* (John Wiley and Sons, Inc., New York 1959).