



Fig. 8. Globular embryo in the suspended cells.

- ⁹ F. SKOOG and C. O. MILLER, Symp. Soc. expt. Biol. 11, 118 (1957).
¹⁰ S. GUPTA, M. BASU and V. N. GADGIL, Proc. of the Symposium on control mechanisms in cellular processes. Bhabha Atomic Research Centre, Bombay, Feb. 1-3 (1973), p. 473.
¹¹ F. C. STEWARD, M. O. MAPES and P. V. AMMIRATO, *Plant Physiology a Treatise* (Ed. F. C. STEWARD; Academic Press, New York 1969), p. 329.

were in direct contact with the environment and free from physiological restraint of others. Limiting factors controlling differentiation in callus tissue were assumed to be due to auxin/kinin ratio^{9,10} or sequential omission of auxin and kinetin from the basic medium¹¹. In the suspension culture of *Nigella*, embryogenesis was obtained by omission of auxin and kinetin from the Ms + NAA + CM medium and sequentially growing the cells in different media as described.

Summary. In suspension culture 91% free cells of *Nigella sativa* was obtained in WHITE's medium supplemented with casein hydrolysate, inositol and adenine. Ploidy distribution pattern was similar in cell clumps of different sizes and free cells. Chromosomal irregularities were more in free cells. A number of globular embryoid were formed when casein hydrolysate, inositol and adenine were added in the medium after subsequent omission of auxin and coconut milk.

S. BANERJEE and S. GUPTA

*Tissue Culture Laboratory, Department of Botany,
 Bose Institute, 93/1 Acharya Prafulla Chandra Road,
 Calcutta 700009 (India), 24 September 1974.*

Mitoseaktivität und Zellzyklus unter Begasung mit subletalen SO₂-Konzentrationen bei der Wasserlinse (*Lemna minor* L.)

Effects of Low SO₂ Concentrations on the Mitotic Activity and on the Cell Cycle of Duckweed (*Lemna minor* L.)

Niedere SO₂-Konzentrationen in der Luft vermögen in Pflanzen nachweisbare stoffwechselphysiologische Umstimmungen hervorzurufen¹. Wirkungen auf die Meristemtätigkeit und auf den damit verbundenen Metabolismus sind selten untersucht worden, obwohl diese Bereiche von zentraler Bedeutung für das Überleben einer Pflanzenart in immissionsgefährdeten Gebieten sind. Die wenigen bekannten Befunde bekräftigen diese Feststellung. In den vergangenen Jahren wurde berichtet von einer mutagenen Wirkung von Na-bisulfit², von einer Störung der DNS-Replikation³, von einer Blockierung der Phenylalanin-tRNAs⁴, von einer Erhöhung der Chromatidenbruchrate⁵, von einer Limitierung des Thymidineinbaus und Reduktion der Mitosekerne⁶ und von einer Hemmung einer Nukleosidphosphotransferase¹.

Die Wasserlinse (*Lemna minor* L.) hat sich in verschiedener Hinsicht als geeignete Indikatorpflanze für die Auswirkungen niedriger SO₂-Immissionen erwiesen^{7,8}. Sie wurde daher, obwohl ihre Morphologie noch viele Rätsel aufgibt und sie zytologisch schwer zu bearbeiten ist, herangezogen um die Mitoseaktivität und den Zellzyklus unter Begasung mit subletalen SO₂-Konzentrationen zu überprüfen.

Die Anzucht und die Begasung der Versuchspflanze ist andernorts beschrieben^{7,9}. Die zytologischen Untersuchungen wurden an 5 µm Dünnschnitten und an Quetschpräparaten durchgeführt. Als geeignete Farbstoffe haben sich Chrysoidin, Hämatoxylin «Delafield» und basisches Fuchsin erwiesen¹⁰. Die stark gefärbten Partien setzen sich aus verschiedenen Meristemen zusammen. Sie umfassen die basalen Pole der jungen Glieder, die Seitenknospen in den lateralen Taschen und die rückwärts gelegenen Adventivwurzeln. Beim Lemnen-glied handelt es sich um das ehemalige Apikalmeristem, das infolge frühzeitiger Abflachung zu einem Phyllo-

kladium umgewandelt wird¹¹. Die Präparation der Mikroautoradiographien erfolgte nach dem Stripping-filmverfahren¹². Für die 1 h Pulsfütterung wurde ³H-markiertes Thymidin verwendet (1 µCi/ml Nährösung, spez. Aktivität 6,7 Ci/mM).

Veränderungen des Kerndurchmessers und des Kernvolumens können bei gleichem Ploidiegrad als generelles Indiz gesteigerter oder reduzierter Kernfunktionen betrachtet werden¹³. Die Bestimmung des Kerndurchmessers in verschiedenen Meristembereichen begaster und unbegaster Wasserlinzen ergibt, dass die untergetauchte Adventivwurzel im Gegensatz zum «Apikalmeristem» kaum auf die Immission anspricht (Tabelle I).

- 1 R. BRÄNDLE, B. STÖCKLI und K. H. ERISMANN, Experientia 31, 511, (1975).
- 2 H. HAYATSU und A. MIURA, Biochem. biophys. Res. Commun. 39, 156 (1970).
- 3 R. SHAPIRO und J. M. WEISGRAS, Biochem. biophys. Res. Commun. 40, 839 (1970).
- 4 R. SHAPIRO, B. BRAVERMAN und W. SZER, Molec. Biol. Rep. 1, 123 (1973).
- 5 T. H. MA, D. ISBANDI, S. H. KHAN und Y. S. TSENG, Mutation Res. 21, 93 (1973).
- 6 R. BRÄNDLE und K. H. ERISMANN, Experientia 29, 586 (1973).
- 7 M. SCHÄRER, Liz. Arbeit Universität Bern (1974).
- 8 H. FANKHAUSER, Liz. Arbeit Universität Bern (1975).
- 9 K. H. ERISMANN und CH. BRUNOLD, Ber. Schweiz. bot. Ges. 83, 213 (1973).
- 10 D. GERLACH, *Botanische Mikrotechnik* (Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1969).
- 11 A. BRUNAUD, C. r. Acad. Sci., Paris, Série D, 278, 2913 (1974).
- 12 R. G. HERRMANN und W. O. ABEL, in *Microautoradiography and Electron Probe Analysis* (Ed. U. LÜTTGE; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1972).
- 13 H. W. ALTMANN, in *Grundlagen der Cytologie* (Eds. G. C. HIRSCH, H. RUSKA und P. SITTE; VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1973).

Der Mitoseindex beträgt auf Quetschpräparaten $5,3 \pm 0,8\%$. Ein Rückgang der Häufigkeit sich teilender Kerne kann nach 77 d Begasung festgestellt werden. Die Werte, die auf Quetschpräparaten und auch auf Dünnschnitten ermittelt wurden, zeigen eine Erniedrigung um 5–6% gegenüber der Kontrolle. Sie können aber der grossen Streuung wegen nicht zuverlässig gesichert werden. Eine kurzzeitige Begasung bewirkt eine drastische Erniedrigung des Markierungsindex und der Thymidininkorporation. Letzteres geht aus der Bestimmung der häufigsten Silberkornzahlen pro markierten Kern hervor (Tabelle II).

Der prozentuale Anteil markierter Mitosephasen (Meta- und Ana/Telophasen) an der Gesamtzahl der entsprechenden Phasen liefert, als Kurve, in Abhängigkeit der Zeit nach Beginn der Pulsfütterung aufgetragen, drei charakteristische Grössen der Kerntätigkeit. Aus der Steigung und dem Maximum der Markierungskurve ergibt sich ein Mass für die Thymidininkorporation, aus der Fläche unter dem ersten Peak die DNS-Synthesedauer und aus der Differenz des ersten und zweiten Kurvenanstiegs die gesamte Zyklusdauer^{14–16}.

Die differenzierte Analyse ergibt für die Wasserlinse (*L. minor* L.) unter den gewählten Bedingungen (25 °C, 4500 lx Dauerlicht) folgende, reproduzierte Werte: Die Zyklusdauer lässt sich zytometrisch nachprüfen, indem man aus dem durchschnittlichen Interphasenkernvolumen den DNS-Gehalt ableitet¹⁷ und nach der bekannten Korrelation¹⁵ auf die Zyklusdauer schliesst. Der DNS-Gehalt für «Apikalmeristemzellen» beträgt 5,5 pg/Kern. Die Bestimmung der Zyklusdauer ergibt ebenfalls 10,3 h, wovon 4,5 auf die DNS-Synthese entfallen.

Nach 77 d Begasung mit 0,6 ppm SO₂ kann in der gesamten Zyklusdauer keine signifikante Veränderung festgestellt werden, obgleich die S-Phase um 0,5 h verlängert erscheint. Die Markierungskurve steigt geringfügig flacher als die Kontrollkurve, erreicht aber dasselbe Maximum. Die 1 d Begasung bewirkt jedoch, dass die betroffenen Meristeme nur noch während 2,1 h das angebotene Thymidin mit stark reduzierter Rate einbauen.

Die starke Schrumpfung der Zellkerne im «Apikalmeristem» von *L. minor* L. zeigt, dass die Pflanze deut-

lich auf subletale SO₂-Konzentrationen anspricht. Die Immission greift unterschiedlich in den verschiedenen Meristembereichen Tunika und Corpus ein. Die Tendenz, dass SO₂ meristemspezifisch einwirkt, kann bezüglich der Proliferationsrate angenommen aber nicht gesichert werden, da die Streuungen bei der Bestimmung der Mitose-indices nicht niedrig genug gehalten werden können. Sie sind auch bei *Lemna perpusilla* L. der Ausdruck dafür, dass in den Präparaten stets Zellpopulationen von unterschiedlicher Teilungsrate vermischt vorliegen¹⁸. Die unterschiedliche Reaktion der Meristeme nach langer Begasung äussert sich in kleinen Gliedern aber normaler Wachstumsrate, wobei diese anfänglich gegenüber der Kontrolle reduziert war⁸. Eine ähnliche Adaptation scheinen die Vorgänge bei der Thymidininkorporation anzustreben. Der Immissionsschock bei der kurzzeitigen Begasung führt vorerst zu einer starken Hemmung der Inkorporation. Nach langfristiger Begasung hat sich der Organismus jedoch angepasst, indem die schwach gedämpfte Syntheseleistung durch eine mässige Verlängerung der S-Phasendauer kompensiert wird. Die Einschleusung des Thymidins in den Weg der normalen DNS-Replikation kann chemisch-enzymatisch gebremst werden^{1–6} oder durch Veränderungen notwendiger Membranstrukturen^{19, 20} und Transportsysteme²¹ gestört werden. Thymidin gilt zwar nicht als essentielle Vorstufe der DNS-Synthese, kann aber durch seinen Anfall bei Differenzierungsvorgängen von vielen Organismen wiederverwendet werden^{22, 23} und vor allem in der DNS-Reparatursynthese eine entscheidende Rolle spielen²³. Dieser Reparaturmechanismus scheint bei starker, z. B. saisonbedingter Strapazierung besonders anfällig auf SO₂ zu sein^{5, 24}.

G ₁ -Phase (= präsynthetische Interphase)	2,0 h
S-Phase (= DNS-Synthesephase)	4,4 h
G ₂ -Phase (= postsynthetische Interphase)	3,3 h
Mitose	0,6 h
Zellzyklusdauer total	10,3 h

Tabelle I. Durchmesser der Interphasenkerne in Meristemen von *L. minor* L. nach 77 d Begasung

		Kontrolle	0,6 ppm SO ₂
Adventivwurzel	Rhizodermis	4,1 \pm 0,25	4,00 \pm 0,3
	Cortex	5,95 \pm 0,75	5,55 \pm 0,6
«Apikalmeristem»	Tunika	3,75 \pm 0,35	3,35 \pm 0,2
	Corpus	5,35 \pm 0,45	4,05 \pm 0,25 ^a

Angaben in $\mu\text{m} \pm$ Standardabweichung. ^a $\alpha = 5\%$.

Tabelle II. Markierungsindex und häufigste Silberkornzahlen 30 min nach Fütterung (1 d Vorbegasung, Thymidinfütterung während der letzten h)

	Markierungsindex ^a	Häufigste Kornzahl/Kern ^b
Kontrolle	16,3 \pm 1,3	13 – 15
0,6 ppm SO ₂	5,8 \pm 1,0	7 – 9

^a%-Zahl markierter Kerne \pm Standardabweichung. ^bAuswertung nach Smirnov-Text, $\alpha = 5\%$.

¹⁴ D. GERECKE, Naturwissenschaften 57, 360 (1970).

¹⁵ J. VAN'T HOF, Expl Cell Res. 39, 48 (1965).

¹⁶ J. M. MITCHISON, *The Biology of the Cell Cycle* (Cambridge University Press, London 1971).

¹⁷ K. P. BAETCKE, A. H. SPARROW, C. H. NAUMANN und S. S. SCHEMNER, Proc. natn. Acad. Sci., USA 58, 533 (1972).

¹⁸ R. HALABAN, Plant Physiol. 50, 308 (1972).

¹⁹ U. LÜTTGE, C. B. OSMOND, E. BALL, E. BRINCKMANN und G. KINZE, Plant Cell Physiol. 13, 505 (1972).

²⁰ M. ALFERT und N. K. DAS, Proc. natn. Acad. Sci., USA 63, 123 (1969).

²¹ P. G. W. PLAGEMANN, D. P. RICHEY, J. M. ZYLKA und J. ERBE, Expl Cell Res. 83, 303 (1974).

²² R. D. MACLEOD, Ann. Bot. 35, 237 (1971).

²³ R. WERNER, Nature New Biol. 233, 99 (1971).

²⁴ Wir danken dem Schweiz. Nationalfonds für die Unterstützung (Nr. 3.866.72).

B. STÖCKLI, R. BRÄNDLE and
K. H. ERISMANN

*Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Bern,
Altenbergrain 21, CH-3013 Bern (Schweiz),
17. April 1975.*