

Absorption und Transport markierter Aminosäuren durch Wurzeln von *Zea mays*

Autor(en): **Bolli, Heinz Karl**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **77 (1967)**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-54319>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Absorption und Transport markierter Aminosäuren durch Wurzeln von *Zea mays*

Von *Heinz Karl Bolli*

Manuskript eingegangen am 17. November 1966

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	62
II. Methodik	
1. Isotope	64
2. Versuchspflanzen	66
3. Fütterung	67
4. Gefriertrocknung	68
5. Mikroautoradiographie	
a) Methode	70
b) Modellversuche und Artefakte	72
6. Bestimmungen im Flüssigkeits-Scintillationsspektrometer	
a) Gesamtaktivität	75
b) Löslicher und unlöslicher Anteil	77
III. Ergebnisse	
1. Die erste Phase der Absorption	77
2. Absorption von Aminosäuren in verschiedenen Längszonen der Wurzel	
a) Qualitative Vergleiche zwischen verschiedenen Aminosäuren	79
b) Bedeutung der Wurzelhaare	80
3. Verteilung der absorbierten Aminosäuren auf verschiedene Gewebe	82
4. Absorption und Fixierung der Aminosäuren	
a) Qualitative Untersuchungen an Autoradiographiepräparaten	83
b) Quantitative Untersuchungen	84
c) $C^{14}O_2$ -Produktion aus D-Leucin-1- C^{14}	87
5. Ferntransport	88
IV. Besprechung der Ergebnisse	89
V. Zusammenfassung	94
Literaturverzeichnis	96

Abkürzungen

Cab-O-Sil	Siliziumdioxidpuder (Godfrey L. Cabot, Inc., Boston)
cpm	Impulse pro Minute
dpm	Zerfälle pro Minute
FS	Free Space
HMX	1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-tetra-cyclo-octan
mM	Millimol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	5-Phenyloxazol
US	Ultraschall

I. Einleitung und Problemstellung

In der Literatur sind recht wenig Angaben über die Aufnahme von Aminosäuren durch höhere Pflanzen zu finden. Dies überrascht, wenn man die Bedeutung der Aminosäuren für den Stickstoffmetabolismus vor Augen führt. Es ist seit einiger Zeit erwiesen, dass die Pflanze viele organische Stoffe, auch körperfremde, leicht absorbieren und transportieren kann (Winter und Willeke, 1951; Brian et al., 1951; Winter et al., 1959 a-c), und es ist nicht auszuschliessen, dass organische, stickstoffhaltige Verbindungen des Bodens für die Ernährung auch höherer Pflanzen eine Rolle spielen können.

Bei der Aufnahme von Aminosäuren durch Pflanzen muss ähnlich wie bei anorganischen Salzen zunächst Diffusion in den «Free Space» (FS) erwogen werden, ein Vorgang, der in wenigen Minuten beendet ist.

Der FS lässt sich gliedern in einen «Water Free Space» (WFS), in dem die Konzentration von Elektrolyten und Anelektrolyten gleich derjenigen im Aussenmedium ist, und dem «Donnan Free Space» (DFS), wo infolge anwesender indiffusibler Ionen die Aufnahme mobiler Kationen und Anionen nicht gleich ist wie im WFS, da sich Donnan-Gleichgewichte einstellen.

Die Diskussion um die örtliche Lage des FS ist sowohl für anorganische Salze als auch für Aminosäuren unseres Wissens bis heute noch offen. Levitt (1957) argumentiert überzeugt für eine Lage des DFS in den Zellwandräumen. Dainty und Hope (1959) verglichen die reversible physikalische Komponente der Aufnahme von Salzen in intakte *Chara*-Pflanzen mit derjenigen von isolierter Zellulose der gleichen Art und folgerten ebenfalls, dass der Hauptteil des DFS in der Zellwand lokalisiert sei. Nach dieser Sicht wäre das Plasmalemma eine wirkliche Barriere für das passive Eindringen von Stoffen. Hope und Stevens (1952),

Butler (1953), Epstein (1956) vermuten, dass wenigstens ein Teil des «Apparent» FS im Zytoplasma liegt.

Gleichzeitig zu der ersten Phase der Aufnahme und noch weiter dauernd verläuft für Aminosäuren eine zweite Phase mit wesentlich langsamerer Aufnahme. Sie zeigt Merkmale wie Hemmbarkeit durch Dinitrophenol und Cyanid, Stimulierung durch Indolylessigsäure, hohe Temperaturabhängigkeit und muss als aktiver Prozess angesehen werden, während die erste Phase gegenüber Dinitrophenol unempfindlich ist (Birt und Hird, 1958a) und passiv erfolgt.

Nach den modernen Carrierhypothesen wird die Aminosäure während ihres Transportes vorübergehend an einen Überträger (Carrier) gebunden und mit dessen Hilfe durch die «osmotische Schranke» geschleust. Der Umstand, dass Aminosäuren in isomeren Formen existieren, erlaubte, die Natur des hypothetischen Carriers näher zu prüfen. Enzymatische Reaktionen verlaufen ja weitgehend stereospezifisch. Ist der Aufnahme-mechanismus enzymatischer Natur, müsste eine ähnliche Spezifität beobachtet werden können.

Birt und Hird (1956) verglichen die Aufnahme von L- und D-Isomeren durch Karottenscheiben und fanden für D-Histidin eine deutlich geringere Absorptionsrate als für L-Histidin, während für Phenylalanin, Valin und Leucin keine signifikanten Unterschiede zwischen L- und D-Formen beobachtet wurden. Die Absorption der untersuchten Isomere war durch Dinitrophenol und Cyanid hemmbar. In kinetischen Untersuchungen stellten Birt und Hird (1958b) eine gegenseitige Beeinflussung der Absorption verschiedener Aminosäuren, darunter auch D-Isomere, fest. Es ergab sich allerdings kein einheitliches Bild, doch scheint ein für mehrere Aminosäuren gemeinsames Transportsystem vorzuliegen, ähnlich wie von tierischen Zellen berichtet wird (Heinz, 1961).

Es stellt sich die Frage, was mit den aufgenommenen D-Aminosäuren in der Pflanze weiter geschieht. El-Shishiny und Nossier (1957a, b), Birt und Hird (1958a) verneinen aufgrund ihrer Untersuchungen eine Verwendbarkeit der D-Isomere im Stoffwechsel.

Joy (1962) untersuchte Absorption und Transport der Proteinamino-säuren Glutamin, Glutaminsäure und Glycin sowie der unnatürlichen 2-Aminoisobuttersäure. Die Säuren wurden C¹⁴-markiert Wurzeln von Zuckerrüben angeboten. Durch Autoradiographie ganzer Pflanzen auf Röntgenfilm konnte für die Proteinamino-säuren eine überwiegende Akkumulation in den jüngsten Blättern erkannt werden. Aus dieser Selektion sowie dem Umstand, dass mit heissem Wasserdampf abgetötete Blattstiele keine Proteinamino-säuren weiterleiteten, folgerte Joy auf Phloemtransport. Die Verteilung von 2-Aminoisobuttersäure erfolgte hingegen

ziemlich gleichmässig in der ganzen Pflanze, und das Abtöten durch Dampf hatte geringen Einfluss, was auf Xylemtransport schliessen liess.

Sofern nach den Ergebnissen von Joy für Protein- und Nichtprotein-aminosäuren zwei verschiedene Transportwege existieren, sollte in den Wurzeln auch ein Mechanismus vorhanden sein, durch welchen die verschiedenen Typen von Aminosäuren separiert und in verschiedene Transportbahnen gelenkt werden können. Bollard (1956), van Die (1961, 1963) berichten allerdings auch bei Proteinaminosäuren über Xylemtransport von der Wurzel in den Spross. Seit einer Reihe von Jahren ist ja bekannt, dass der Blutungssaft vieler Pflanzen Aminosäuren enthalten kann. Es ist wohl denkbar, dass die gewählten Versuchsbedingungen, Art und Alter der Pflanzen massgeblichen Einfluss auf den Transportweg haben können.

Es schien uns in diesem Zusammenhang wünschenswert, für die Untersuchungen sowohl Proteinaminosäuren wie auch unnatürliche Aminosäuren, darunter ein D-Isomeres, heranzuziehen. Es wurde nach folgenden Fragestellungen gearbeitet:

1. Wo ist der FS lokalisiert, und auf welchem Weg gelangen Aminosäuren ins Innere der Wurzel?
2. Wie sind verschiedene Wurzelzonen an der Absorption von Protein- und Nichtproteinaminosäuren beteiligt?
3. Wie verteilen sich die absorbierten Protein- und Nichtproteinaminosäuren in den verschiedenen Geweben der Wurzel?
4. Wie ist das Verhältnis von freien zu gebundenen Aminosäuren nach verschiedenen Absorptionszeiten?
5. Welche Gewebe kommen für einen Ferntransport in Frage?

Intakte oder abgeschnittene Wurzeln von *Zea mays* wurden mit C^{14} - oder mit H^3 -markierten Aminosäuren über eine Nährlösung gefüttert und anschliessend die Wurzeln, bei Fütterung von intakten Pflanzen zum Teil auch der Spross, gefriergetrocknet. Die Auswertung erfolgte entweder mit Hilfe der Mikroautoradiographie oder durch direkte Aktivitätsbestimmungen im Flüssigkeits-Scintillationsspektrometer.

II. Methodik

1. Isotope

Cloves (1958) untersuchte die Proteinsynthese von *Zea mays* mit L-Leucin- C^{14} . Nach einer Applikationszeit von 1–2 Tagen wurden die

Wurzelstücke fixiert. Ein Teil der Wurzeln wurde ausgewaschen und sowohl der Extrakt wie der Rückstand papierchromatographisch analysiert. Die einzige Aktivität war im Leucin-Isoleucin-Fleck festzustellen. Leucin schien damit für die eigenen Untersuchungen gut geeignet, da Gewissheit bestand, Absorption und Transport hauptsächlich von Leucin und nicht eines Umwandlungsproduktes verfolgen zu können. Um eine gute Auflösung in den Mikroautoradiographien zu erzielen, erschien es vorteilhaft, H^3 -markiertes Leucin zu verwenden. Da das D-Isomere nur im Racemat erhältlich war, wurde eine Racemattrennung von DL-Leucin-4,5- H^3 selbst durchgeführt.

Grundlegende Arbeiten über die Trennung racemischer Aminosäuren durch selektive enzymatische Reaktion verdanken wir Fodor et al. (1949), Price et al. (1949), Gilbert et al. (1949), Greenstein et al. (1950, 1951), Birnbaum et al. (1952). Die Auftrennung erfolgt nach folgendem Prinzip: Primäre und sekundäre Amine reagieren mit Essigsäureanhydrid oder Acetylchlorid unter Bildung von Acetylderivaten, in denen ein Wasserstoffatom der Aminogruppe durch einen Acetylrest ersetzt ist. Werden N-acetylierte, racemische Aminosäuren dem Einfluss von Nierenacylase I oder von Carboxypeptidase unterworfen, wird nur das L-Isomere angegriffen. Die entstehende freie Aminosäure und die acetylierte D-Aminosäure können in einem einzigen Schritt getrennt werden, da die L-Aminosäure in nichtwässrigen Lösungsmitteln unlöslich ist, in denen sich die acetylierte D-Aminosäure löst. Die D-Aminosäure wird nun noch durch Hydrolyse freigesetzt.

Die Reaktionen wurden nach Vorschriften von Greenstein (1957) durchgeführt. Ausgegangen wurde von 2,15 mc, spez. Aktivität 151 mc/mM. Da 100 mg als minimale Arbeitsmenge betrachtet wurden, musste entsprechend inaktives Trägermaterial zugesetzt werden. Nach Acetylierung wurden 101 mg DL-Acetylleucin isoliert. Eine Prüfung des gewonnenen Acetylderivates auf noch freies Leucin mittels eines Ninhydrinfarbttests ergab ein negatives Resultat. Der Verlauf der enzymatischen Reaktion (verwendetes Enzym Acylase I) wurde durch Probeentnahmen und Bestimmung des freigesetzten L-Leucins verfolgt. Nach drei Stunden war die Reaktion beendet. Isoliert wurden schliesslich 23 mg L-Leucin und nach erfolgter saurer Hydrolyse 20 mg D-Leucin.

Weiter kamen zur Anwendung L-Leucin-4,5- H^3 , spez. Aktivität 8,2 c/mM, 2-Aminoisobuttersäure- H^3 (G), spez. Aktivität 1,28 c/mM und L-Histidin (Ring-2- C^{14}), spez. Aktivität 35,0 mc/mM, alle vom Radiochemical Centre Amersham, Buckinghamshire. Später konnte noch D-Leucin-1- C^{14} , spez. Aktivität 24,6 mc/mM, von der New England Nuclear Corp. bezogen werden.

2. Versuchspflanzen

Für die Untersuchungen musste eine Pflanze gewählt werden, die rasch und in grossen Mengen jederzeit gezogen werden konnte. Die Wahl fiel auf *Zea mays*. Die Samen wurden nach Frenzel (1961) sterilisiert und in Petrischalen auf Filterpapier im Dunkeln bei 25 °C gekeimt. Nach 3 Tagen wurden die Keimlinge in der Impfkammer in gleichfalls sterile Kulturgefässe (Abb. 1) übertragen und in belüfteter Nährlösung nach Hoagland Nr. 3 im Treibhaus weitergezogen. Für autoradiographische Untersuchungen dienten Pflanzen im Alter von 4–14 Tagen, für Messungen im Scintillationsspektrometer solche im Alter von 4–5 Tagen, die zum Teil direkt aus den Keimschalen stammten. In diesem Zeitpunkt waren die verwendeten Wurzeln 5–8 cm, die Sprosse 3–4 cm lang.

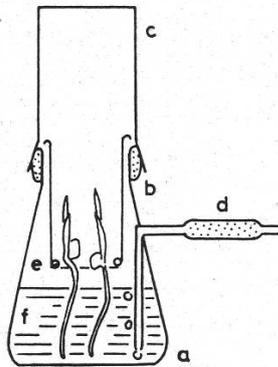


Abbildung 1

Kulturgefäss zur sterilen Anzucht von *Zea mays*

a Weithalslerlenmeyerkolben 500 ml; b Wattering; c Becherglas; d Belüftungsrohr; e Aufhängevorrichtungen mit Pflanzen; f Nährlösung

Ratner et al. (1963) untersuchten an isolierten Luzernewurzeln und an ganzen Erbsenpflanzen die Assimilation von Aminosäuren hinsichtlich ihrer Bedeutung als Stickstoffquelle. Asparagin und Glutamin erwiesen sich im Vergleich zu NaNO_3 fast gleichwertig. Leucin, Phenylalanin, Valin und Tyrosin, in vermindertem Grad auch die D-Isomere, hemmten dagegen Proteinsynthese und Wachstum der Wurzeln und schienen toxisch zu wirken. Da durch eine solche Giftwirkung auch das Transportsystem beeinflusst werden könnte, wurde die Wirkung von L-Leucin auf *Zea mays* in einem Freiland- und in einem Treibhausversuch geprüft. Bei 25 in Wasser gekeimten, 5 Tage alten Pflanzen wurde das Nährgewebe sorgfältig von den Kotyledonen wegpräpariert und die Pflanzen in offene Kulturgefässe mit Nährlösung ohne Nitrat, jedoch mit 0,001 Mol/l L-Leucin eingesetzt. Als Kontrolle dienten entsprechende Pflanzen in Nährlösung ohne Stickstoff und in solcher mit Zusatz von 0,001 Mol/l NaNO_3 . Weiter wurden je 25 Pflanzen mit Nährgewebe in vollständiger Nähr-

lösung mit und ohne Leucinzusatz gezogen. Alle 2–3 Tage wurden sämtliche Lösungen erneuert und nach 20 Tagen die Trockengewichte der Pflanzen ermittelt. Die Ergebnisse des Treibhausversuches sind auf Tafel 1, Abbildung 1, und in Tabelle 1 dargestellt. Eine hemmende Wirkung auf das Wachstum durch L-Leucin konnte bei der verwendeten Konzentration in keinem der beiden Versuche festgestellt werden. L-Leucin vermochte in der Mangelkultur in beschränktem Mass als Stickstoffquelle zu dienen.

Tabelle 1
Einfluss von L-Leucin auf das Wachstum von *Zea mays*

Nährmedium pH 5,0	Spross TG in mg/Pfl.	Wurzel TG in mg/Pfl.	Spross TG in % Kontr.	Wurzel TG in % Kontr.
A Mangellösung mit NaNO ₃	73,9	21,7	160	122
B Mangellösung ohne N (Kontrolle)	46,3	17,8	100	100
C Mangellösung mit L-Leucin	49,4	20,5	107	115
D Volle Nährlösung (Kontrolle)	214	57,5	100	100
E Volle Nährlösung mit L-Leucin	207	58,4	97	102

A–C Pflanzen ohne Nährgewebe
D–E Pflanzen mit Nährgewebe

3. Fütterung

Die Fütterung der Wurzeln geschah durch Eintauchen in die jeweilige belüftete Isotopenlösung. Für Autoradiographiezwecke gelangten Aktivitäten zwischen 25–250 $\mu\text{c/ml}$ für H³, von 2 $\mu\text{c/ml}$ für C¹⁴, spez. Aktivitäten wie früher angegeben, zur Anwendung. In der Regel wurden die Aminosäuren zusammen mit 1:10 verdünnter Nährlösung nach Hoagland, pH 5,0, appliziert.

Für Versuche, die im Flüssigkeits-Scintillationsspektrometer ausgewertet wurden, genügten geringere Aktivitäten, für H³ gewöhnlich 0,75 $\mu\text{c/ml}$, für C¹⁴ 0,15 $\mu\text{c/ml}$. Um mit vergleichbaren Stoffkonzentrationen arbeiten zu können, wurden die Isotope bei diesen Versuchen durch inaktive Zusätze meist auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^{-4}$ mM/ml ein-

gestellt. Pro Fütterung kamen 25 ganze Pflanzen oder 50 isolierte Wurzelstücke zur Verwendung. Sie wurden zunächst in einen kleinen, gelochten Kunststoffeinsatz verbracht und dann in ein grösseres Gefässchen mit der Isotopenlösung gestellt. Dies hatte den Vorteil, dass alle Wurzeln gleichzeitig inkubiert werden konnten, zudem war die Übertragung in weitere Lösungen einfach und zeitlich definierbar.

Alle Versuche wurden in einer geschlossenen Fütterungskammer bei hoher Luftfeuchtigkeit und 25 °C durchgeführt, die Versuchszeiten variierten von 5 min bis 24 h.

4. Gefriertrocknung

Die Gefriertrocknung ist eine zuverlässige Methode, Zellen und Gewebe mit wasserlöslichen Stoffen möglichst unverändert zu erhalten. Die in gefrorenem Zustand getrockneten Eiweisse denaturieren nicht, ihre kolloidale Dispersion und damit auch das ursprüngliche Volumen bleiben weitgehend erhalten. Trotz diesen bestechenden Eigenschaften wurde die Gefriertrocknung bisher für histologische Zwecke an pflanzlichem Gewebe, im Gegensatz zu tierischem, erst wenig angewendet, weil die Zellulosewände dem Verfahren hinderlich sind. Hermans (1946) zeigte, dass die Geschwindigkeit, mit der Wasser durch Zellulose hindurch diffundiert, mit abnehmendem Feuchtigkeitsgehalt sehr rasch sinkt. Wird in üblicher Weise mit Hochvakuum gearbeitet, trocknen die oberflächlichen Zellschichten rasch vollständig aus. Dadurch kann das Wasser der tiefer gelegenen Schichten nicht mehr hindurchdiffundieren, die Trocknung bleibt unvollständig, Paraffinfiltration ist erschwert, und die Gewebe zerreißen beim Schneiden.

Branton und Jacobson (1961) testeten geeignete Trocknungsbedingungen. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn ein Gasstrom definierten Wasserdampfgehaltes bei 15 mm Hg Druck durch die Apparatur geleitet wurde. Der erhöhte Dampfdruck verhindert die vollständige Austrocknung der peripher gelegenen Zellulosemembranen, das Wasser kann besser austreten, und nachherige Infiltration mit Paraffin ist möglich.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden die Pflanzenteile nach erfolgter Fütterung nach Branton und Jacobson, etwas verändert, getrocknet.

Die Trocknungsapparatur ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Trocknungskammer taucht in ein Alkoholbad, das mittels eines Kühlaggregates dauernd auf -35 °C gehalten wird. Eine Silikagelsäule, durch die Aussenluft angesaugt werden kann, steht in Verbindung mit der

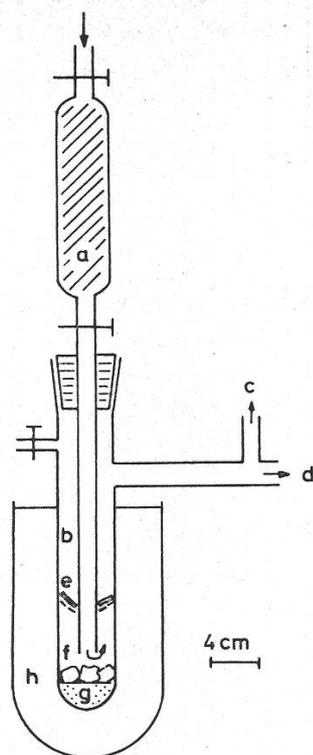


Abbildung 2

Gefriertrocknungsapparatur

a Säule mit Silikagel; b Trocknungsrohr; c Druckanzeiger; d Kondensator, Vakuumpumpe; e Trocknungsgut; f Eis; g entgastes Paraffin; h Kühlbad mit 70% Äthanol (-35°C)

Trocknungskammer. Von der Kammer geht ein weiteres Rohr ab zum Vakuummessgerät, dann über eine Gefrierfalle zur Drehschieberpumpe mit Endvakuum 10^{-2} mm Hg. Zuunterst in der Kammer befindet sich entgastes Paraffin, darüber eine etwa 1 cm dicke Eisschicht. In 5 cm Höhe darüber hängt ein Drahtkorbchen, das mit Paraffin an das zentrale Belüftungsrohr gekittet ist und zur Aufnahme des Trocknungsgutes bestimmt ist. Wurzel- oder Sprosssteile werden durch Eintauchen in *n*-Pentan, das vorher mit flüssiger Luft auf den Gefrierpunkt (-130°C) gekühlt wird, rasch eingefroren und in die Trocknungsapparatur verbracht. Nun wird ein partielles Vakuum von 2–5 mm Hg angelegt, indem der Luftstrom an den Hahnen der Silikagelsäule entsprechend eingestellt wird. Die Luft wird zunächst vorgetrocknet, befeuchtet sich über dem Eis im Trocknungsgefäß und zieht am Trocknungsgut vorbei.

Gegen Ende der Trocknung (Dauer 2–3 Tage) ist auch das Eis am Boden des Gefäßes sublimiert, worauf der Trocknungskammer erlaubt wird, sich langsam auf Zimmertemperatur zu erwärmen. Nach einer Nach-trocknungsdauer von einigen Stunden erfolgt, immer noch unter Vakuum, in einem Wasserbad Erwärmung auf 60°C , wodurch das Trockengut mit

dem Körbchen zur Infiltration in das geschmolzene Paraffin sinkt. Nun werden Blöcke gegossen und die Objekte mit dem Mikrotom für Autoradiographiezwecke geschnitten (Schnittdicke 5–10 μ). Für Aktivitätsbestimmungen im Scintillationsspektrometer unterbleibt die Paraffin-infiltration.

Brauchbare Ergebnisse, vor allem für Wurzelspitzen, wurden auch ohne Luftstrom unter sonst gleicher Anordnung bei etwas höherem Vakuum gewonnen.

Über die Leistungsfähigkeit der Methode sollen in Tafel 2 Abbildungen 2 und 3 einen Eindruck vermitteln. Es handelt sich um Mikroautoradiographien eines jungen und eines älteren Wurzelquerschnittes, beide ohne Aktivität. Obwohl die Präparate die ganze Autoradiographieprozedur durchgemacht haben, sind die Gewebe gut erhalten.

Der Frage nach der Höhe der zulässigen Trocknungstemperatur wurde noch Beachtung geschenkt, indem eine Versuchsserie bei einer Kühlbadtemperatur von -58°C getrocknet wurde (Trocknungsdauer 10 Tage). In den mikroautoradiographischen Ergebnissen konnte im Vergleich zu den weniger gekühlten Proben (-35°C) keine andere Verteilung der absorbierten Aminosäuren beobachtet werden.

Ergänzend sei noch die Methode zur histochemischen Bestimmung freier Aminosäuren von Notovny und Owens (1960) erwähnt, nach der für die Entwässerung und Fixierung der Gewebe wasserfreies Dioxan verwendet wird. Nach Fixierung wäscht man das Dioxan schrittweise mit Mischungen von Dioxan und Chloroform aus, infiltriert mit Einbettungsmittel, worauf geschnitten werden kann.

Diese Fixierungsmethode wurde in einigen Autoradiographieversuchen angewendet. Sie lieferte brauchbare Resultate, Gewebeerhaltung und Haftfähigkeit auf der Photoemulsion waren jedoch nicht so gut wie nach Gefriertrocknung.

5. Mikroautoradiographie

a) Methode

Von den in der Literatur beschriebenen Methoden zur Mikroautoradiographie wasserlöslicher Substanzen schien uns das Verfahren von Branton und Jacobson (1962) für Serienuntersuchungen am ehesten geeignet. Mikrotomschnitte von gefriergetrocknetem Gewebe werden auf Teflonfolie von 0,1 mm Dicke und Objektträgerformat aufgereiht. In der Dunkelkammer kommen die Folien über eine gepolsterte Unterlage zu liegen, worauf die Schnitte durch Druckmontage auf Photoplatten mit trockener

Emulsion übertragen werden. Die Platten mit den Schnitten kommen vor der Exposition für 3–5 min auf einen Wärmer bei 45 °C, um einen guten Kontakt zwischen Schnitt und Emulsion zu erzeugen, dann erfolgt Exposition. Nachher werden die Schnitte durch kurzes Eintauchen in eine Lösung aus Celluloseacetat in Aceton und 2-Butanon auf die Emulsion festgeklebt, um Abfallen oder Verschieben während der folgenden Prozeduren zu vermeiden. Es folgt Entparaffinierung in Xylol, Hydratation in einer Alkoholreihe, Entwicklung, Fixierung, Wässern und Einbettung.

Für die eigenen Untersuchungen wurden zunächst Photoplatten von Kodak Ltd., England (Typ Scientific V. 1060 unbacked), zugezogen. Die Platten wurden in der Dunkelkammer auf Objektträgerformat zugeschnitten und so verwendet. Es erwies sich jedoch als praktischer, mit den flüssigen Emulsionen G 5, K 5 und L 4 von Ciba-Ilford AG selbst Photoplatten aus Objektträgern herzustellen. Bezüglich Handhabung kann auf Prescott (1964) verwiesen werden.

Nach eigener Erfahrung ist das Festkleben gefriergetrockneter Gewebe mit Celluloseacetatlösung nicht notwendig, wenn mit exponierten Objekten wie folgt vorgegangen wird:

Entparaffinieren:

1. Eintauchen in Xylol I, 1 s; trocknen mit warmem Föhn, 3 min
2. Xylol I, 1 min
3. Xylol II, 1 min
4. Äthanol I, 1 min
5. Äthanol II, 1 min

Hydratation:

6. Äthanol 96 %, 30 s; trocknen lassen, 5 min
7. Äthanol 96 %, 1 min
8. Äthanol 80 %, 1 min
9. Äthanol 60 %, 1 min
10. Äthanol 40 %, 1 min
11. Äthanol 20 %, 1 min
12. Wasser, 1 min

Photographische Prozesse:

13. Entwickler ID 19 (Ilford), 2 min, 18 °C
14. Stopbad Essigsäure 1 %, 20 s
15. Fixierer Unifix Nr. 1 (Kodak), 8 min
16. Wässern, 20–30 min
17. Eventuell färben mit 0,5 % Toluidinblau bei pH 6, differenzieren in Äthanol 70 %
18. Lufttrocknen, einbetten in Kanadabalsam oder Euparal

Durch das Antrocknen in Schritt 1 und 6 wird eine gute Adhäsion des Gewebes an die Emulsion erzielt, so dass die Objekte kaum mehr abfallen oder sich verschieben. Der unangenehme Arbeitsgang des Klebens mit anschliessender mehrstündiger Trocknung fällt weg, die Lösungen können besser in Objekt und Emulsion eindringen, und der Hintergrund kann niedriger gehalten werden. Weiter wird es möglich, die Objekte schon vor der Exposition zu entparaffinieren (Schritte 1–3). Ein Verwaschen der Aktivität durch Xylol wurde dabei nicht festgestellt, dagegen konnte ein wesentlich besserer Kontakt zur Emulsion erzielt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse wurden hauptsächlich nach dieser veränderten Methode gewonnen. Die Expositionszeiten betragen 2–28 Tage.

Um gebundene von freien Aminosäuren qualitativ unterscheiden zu können, wurde jeweils eine zweite Schnittserie auf Objektträger montiert, entparaffiniert und während 2–6 h unter 3 Wechseln in überschüssiger Aminosäurelösung ausgewaschen. Diese Objekte wurden anschliessend direkt in flüssige Emulsion eingetaucht, getrocknet und exponiert.

Für sauberes Arbeiten in den Lösungen war es zweckmässig, jeweils 10–14 der Objektträger, die als Photoplatten dienten, mit einem freien Ende in einen gemeinsamen Halter einzuspannen. Am Halter, der nicht benetzt wurde, konnten die Objektträger leicht in die Lösungen, für die 100-ml-Bechergläser verwendet wurden, übertragen werden.

b) Modellversuche und Artefakte

In den ersten Mikroautoradiographien nach Methode Branton traten unregelmässige Fleckenmuster auf, die sich über ganze Wurzelquer- oder -längsschnitte erstreckten. Da die Schwärzungen vorwiegend über Zellecken lokalisiert waren, konnte der Eindruck entstehen, als ob besonders die Interzellularräume aktiv wären (Tafel 2, Abb. 4). Nach mehrstündiger Fütterungszeit wäre jedoch vor allem eine hohe intrazelluläre Aktivität zu erwarten gewesen. Deshalb bestand der Verdacht eines Artefaktes, und die Frage wurde mit einem Modellversuch an Holundermark geprüft.

Holundermarkstücklein wurden mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 , 25 $\mu\text{c}/\text{ml}$, spez. Aktivität 2,6 mc/mM , mit L-Leucin- H^3 , 25 $\mu\text{c}/\text{ml}$, spez. Aktivität 2,7 mc/mM oder mit L-Histidin- C^{14} , 2 $\mu\text{c}/\text{ml}$, spez. Aktivität 0,28 mc/mM , infiltriert, gefriergetrocknet und Autoradiographien hergestellt.

Ergebnisse: In Tafel 2, Abbildung 5, ist eine Holundermarkautoradiographie von 2-Aminoisobuttersäure- H^3 abgebildet. Die Zellwände erscheinen praktisch unmarkiert, während Schwärzungen in Zellecken, entlang von Zellwänden, zum Teil auch mitten in Vakuolen auftreten. Diese Bilder

der Aktivitätsverteilung wurden mit allen drei verwendeten Aminosäuren gefunden.

Statt der aktiven Lösungen wurde zum Vergleich 0,5% Toluidinblaulösung bei pH 6 angewendet. Die Farbstoffverteilung konnte vor und nach Gefriertrocknung direkt optisch verfolgt und mit den autoradiographischen Ergebnissen der aktiven Lösungen verglichen werden.

Handschnitte von Holundermark wurden mit Toluidinblaulösung infiltriert und die Farbstoffverteilung sofort im Mikroskop untersucht. Weitere Holundermarkstücklein wurden nach Farbstoffinfiltration gefriergetrocknet, in Paraffin eingebettet und mit dem Mikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden trocken auf Objektträger montiert, mit Xylol entparaffiniert, in Kanadabalsam eingebettet und mikroskopisch untersucht.

Ergebnisse: Frisch infiltrierte Toluidinblaulösung füllt die Zellhölräume gleichmässig aus. Die Zellwände haben zusätzlich Farbstoff adsorbiert und erscheinen intensiver blau als die Hohlräume. Nach Gefriertrocknung (Tafel 2, Abb. 6) sind die Zellwände immer noch blau gefärbt. Die Hohlräume sind optisch leer mit Ausnahme kleiner Krümel von violetter Färbung.

Die ähnliche Verteilung der Schwärzungen in den Holundermark-Autoradiographien und der Krümel im Toluidinversuch ist auffallend (Tafel 2, Abb. 5 und 6). Wenn wir eine Interpretation dieser Erscheinungen versuchen wollen, muss zunächst von der Tatsache ausgegangen werden, dass sowohl bei den aktiven Aminosäurelösungen als auch beim Toluidinversuch die Hohlräume durch die Infiltration mit der jeweiligen Lösung ausgefüllt waren. Während der Gefriertrocknung erfolgte Sublimation des Wassers, die gelösten Stoffe dagegen blieben, eventuell erst als lockeres Gerüst, in den Hohlräumen zurück und bildeten schliesslich die im Farbversuch beobachteten Krümel. Die Stoffkonzentration der Krümel ist im Vergleich zur Konzentration der Lösungen natürlich viel höher, sie konnte damit möglicherweise die auffallenden Schwärzungen in den Modellautoradiographien erzeugen. Diese Interpretation lässt sich auch auf Versuche mit lebenden Pflanzenzellen übertragen: Die Zellen absorbieren Aminosäuren unter Eintransport in die Vakuolen, womit wir praktisch die gleiche Ausgangssituation wie bei den Modellversuchen mit Holundermark vorfinden. Sofern diese Auslegung richtig ist, dürfte es nach Methode Branton schwierig sein, den aufgenommenen Tracer intrazellulär zu lokalisieren, sobald grössere Mengen in den Vakuolen akkumuliert sind.

Verwirrende Fleckenmuster können aber auch wegen unterschiedlichen Kontakts zwischen Objekt und Emulsion zustande kommen. Solche Fälle

sind oft daran zu erkennen, dass die Schwärzungen teilweise (bei gutem Kontakt) scharf auf Zellwände und Plasma begrenzt und kräftig sind, teilweise (bei schlechtem Kontakt) diffus und schwach erscheinen. In der Regel war es nach Methode Branton nicht möglich, bei einer Schnittdicke von 8–10 μ einen gleichmässig guten Kontakt über grössere Gewebeflächen zu erhalten. Die Methode von Lüttge und Weigl (1965), die Schnitte statt durch Erwärmen durch Auftropfen von Äther oder Xylol zu strecken, brachte in den eigenen Versuchen keine Verbesserungen. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn vor der Exposition entparaffiniert wurde.

Obwohl Robertson et al. (1959) und Caro (1964) bei direktem Emulsionskontakt Auflösungen von 0,1–0,2 μ für Tritium angeben, zeigte es sich, dass in der Trockenautoradiographie aus Kontaktgründen nicht mit diesen Massstäben gerechnet werden kann. Wenn man berücksichtigt, wie schwierig quantitative Auswertungen schon bei optimalem Kontakt zur Emulsion infolge der unterschiedlichen Selbstabsorptionskoeffizienten der Zellbestandteile sind (Maurer und Primbsch, 1964; Perry, 1964), lässt sich leicht einsehen, dass mit qualitativen Aussagen die Grenze der angewendeten Mikroautoradiographiemethode bezüglich der intrazellulären Verteilung eines Tracers erreicht ist.

Miller et al. (1964) beschreiben eine Methode zur Autoradiographie wasserlöslicher Stoffe, z.B. in Zellausstrichen, bei der die Objekte, um einen guten Kontakt zu erzielen, mit einer leicht angefeuchteten Emulsion in Kontakt gebracht werden. Durch Eintauchen eines Chrom-Nickel-Drahtringes von 3,5–4 cm Durchmesser in geschmolzene Photoemulsion wird ein dünner Film erhalten und 15–30 min getrocknet. Ein Objektträger, auf dem sich das zu autoradiographierende Material gegen ein Ende hin befindet, wird mit dem Film, der immer noch im Drahttring aufgespannt ist, in Kontakt gebracht. Durch Aufblasen von Atemluft, beginnend am einen Ende, wird der Film klebrig und legt sich über die Objekte, worauf der Drahttring abgezogen werden kann. Nachher wird in üblicher Weise exponiert und entwickelt. Die Methode wurde getestet, indem kleine Tröpfchen von H^3 -Nukleosiden auf Objektträger aufgetragen und autoradiographiert wurden.

Wir haben diese Methode auf ihre Verwendbarkeit bei Schnittpräparaten geprüft. Mit L-Leucin- H^3 oder 2-Aminoisobuttersäure- H^3 gefütterte, gefriergetrocknete Wurzeln wurden nach Einbettung in Paraffin 10 μ dick geschnitten, trocken auf Objektträger montiert, in Xylol entparaffiniert und in der beschriebenen Weise autoradiographiert. Das Ergebnis ist in Tafel 2, Abbildung 7, zu sehen. Die Feuchtigkeit der Atemluft genügte, um Diffusion der Aminosäuren zu bewirken und ein falsches Bild zu erzeugen. Die leichte Wasserlöslichkeit der verwendeten Aminosäuren

sowie die hygroskopische Eigenschaft der gefriergetrockneten Gewebe scheinen die Diffusion derart zu begünstigen, dass die Methode unter diesen Verhältnissen unbrauchbar ist. Als Schwierigkeit trat noch hinzu, dass sich sehr häufig zwischen Gewebe und Film kleine Luftbläschen bildeten, wodurch der gute Kontakt verloren ging. Wenige Sekunden Kontakt mit einer wässrigen Phase genügen also, um leicht wasserlösliche Substanzen in Geweben entscheidend zu verschieben, ein Umstand, dem nicht genügend Beachtung geschenkt werden kann.

6. Bestimmungen im Flüssigkeits-Scintillationsspektrometer

a) Gesamtaktivität

Für die Untersuchungen stand ein Modell der Nuclear Chicago Corporation, System 724, zur Verfügung. Die Zählröhren wurden mit Hilfe von «Channels ratio» und externer C^{14} - und H^3 -Toluol-Standards, teilweise auch mit Hilfe interner C^{14} - und H^3 -Toluol-Standards ermittelt. Sie schwankten für C^{14} je nach Messmethode und Einstellung zwischen 56 bis 84 %, für H^3 zwischen 12–29 %.

Hayes et al. (1956) berichten als erste von Flüssigkeits-Scintillationsmessung in heterogenen Systemen. Helf et al. (1960) suspendieren kristalline Feststoffe in einem Gel-Scintillator, neben anderen Isotopen HMX- C^{14} und HMX- H^3 . Es konnte festgestellt werden, dass die Zählröhre durch Selbstabsorption praktisch nicht reduziert wird, solange die Partikelgröße unter der Reichweite der β -Strahlen liegt. Messschwierigkeiten traten nur mit H^3 auf. Wir versuchten, das gleiche Messprinzip auf gefriergetrocknetes, fein pulverisiertes Pflanzengewebe anzuwenden, wobei es möglich war, auch bei H^3 erniedrigte Zählröhren infolge von Selbstabsorption auszuschalten.

25–30 markierte, gefriergetrocknete Wurzeln wurden in Stücke bestimmter Länge zerschnitten, gleiche Abschnitte zusammen in kleine Porzellantiegel übertragen und die Trockengewichte bestimmt. In jeden Tiegel wurden 100 oder 200 mg feiner, weisser Quarzsand zugegeben und durch Reiben mit einem Glasstößel während 5 min ein feines Pulver erzeugt. Mikroskopische Untersuchung ergab, dass die Zellen völlig aufgebrochen waren. Mit Hilfe kleiner Teflonschäufelchen konnte das Pulver leicht in Messgläschen gewischt werden. Als Scintillationsflüssigkeit diente Toluol-PPO-POPOP, als Gelmittel CAB-O-Sil.

Die Methode wurde an vier verschiedenen Proben von je 50 Wurzelstücken geprüft. Die Stücke wurden mit L-Leucin- H^3 gefüttert, gefriergetrocknet und jede Probe in nachstehender Weise weiterbehandelt: Von 10 Wurzelstücken wurde die Aktivität nach der oben beschriebenen

Weise gemessen. Die Zählzählbeute zur Umrechnung von cpm auf dpm wurde mit Hilfe von internen H^3 -Standards bestimmt. Die restlichen 40 Stücke wurden ebenfalls pulverisiert, in 20 ml heissem 80%igem Äthanol suspendiert und für 10 min einer Ultraschallbehandlung unterzogen. US-Behandlung bewirkte zunächst eine weitere Zerkleinerung der suspendierten Teilchen und gleichzeitig eine homogene Verteilung in der alkoholischen Lösung.

Nach Abbruch der US-Behandlung wurden sofort 0,5 ml abpipettiert und in ein Messgläschen übertragen. Die Aktivität der abpipettierten Aliquote wurde nach Zusatz von Toluol-Äthanol-PPO-POPOP-Scintillator und CAB-O-Sil gemessen und ergab nach Umrechnung auf das Totalvolumen wieder die Gesamtaktivität. Würden nun nach der ersten Messmethode infolge von Selbstabsorption Ausbeuteverluste bewirkt, müssten nach der zweiten Methode höhere Werte erhalten werden, da einerseits durch die weitere Zerkleinerung der Teilchen während der US-Behandlung die Selbstabsorption verringert wird, andererseits das herausgelöste freie L-Leucin ohne Selbstabsorption gemessen werden kann. Dieser gelöste Anteil betrug über 90% der gemessenen Gesamtaktivität, wie nach Zentrifugieren und erneuter Messung der nun geklärten Lösung berechnet werden konnte.

Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 2 dargestellt. Die Bestimmungen nach beiden Methoden decken sich im Rahmen der zu erwartenden Variabilität der Proben, die Selbstabsorptionsverluste können somit nicht wesentlich sein.

Tabelle 2

Methodische Messversuche. Erklärungen siehe Text

Ver-such	Wurzelzonen mm v. Spitze	1. Direkte Messung dpm/10 Stück · 10 ³	2. US-Behandlung dpm/10 Stück · 10 ³	Abweichung 1 v. 2 %
1	0-5	75,6	77,9	+ 3
2	0-5	86,3	74,8	-13
3	5-15	83,2	72,0	-13
4	5-15	79,9	70,0	-12

Da die Scintillationsflüssigkeit das fein pulverisierte Gewebe (im Gegensatz zu kristallinen Teilchen) völlig durchdringt, gelangt sie auch in unmittelbare Nähe der nicht an der Oberfläche der Teilchen liegenden Strahlungsquellen. Es scheint, dass die farblosen Gewebeteilchen für die ausgestrahlten Photonen weitgehend durchlässig sind und dass vor allem dieser Umstand Selbstabsorptionseffekte ausschaltet.

b) Löslicher und unlöslicher Anteil

Um in gefütterten Wurzeln den Anteil der freien und fixierten Isotopen bestimmen zu können, wurde wie folgt verfahren: 50 gefriergetrocknete Wurzelstücke mit bekanntem TG wurden wie unter a zermahlen und in 20 ml heissem 80%igem Äthanol suspendiert. Nach 10 min US-Behandlung wurde sofort 0,5 ml abpipettiert und die Aktivität gemessen. Der Rest wurde während 20 min bei 30 000 g zentrifugiert und von der geklärten Lösung wieder 0,5 ml zur Messung verwendet. Nach Umrechnung auf das Gesamtvolumen konnte aus der ersten Messung die Gesamtaktivität und aus der zweiten der lösliche Anteil erhalten werden. Jede Pipettierung und jede Messung wurde doppelt ausgeführt.

III. Ergebnisse

1. Die erste Phase der Absorption

In Abbildung 3 ist die Absorption von 2-Aminoisobuttersäure- H^3 als Funktion der Zeit aufgetragen. Aus den Kurven lässt sich eine einheitliche Initialphase der Absorption von etwa 10 min Dauer herauslesen. Abbildung 4 veranschaulicht den gleichen Versuch mit L-Histidin- C^{14} .

Autoradiographische Untersuchungen an Wurzelspitzen ergaben, dass die Aminosäuren nach 10 min Fütterungsdauer schon bis in den Zentralzylinder vorgedrungen waren, wobei das Konzentrationsgefälle von der Epidermis ins Zentrum der Wurzel bereits ausgeglichen erschien. Zellwände, Zytoplasma und auch die Zellkerne waren kräftig markiert. Nach 5 min Fütterungsdauer war der Konzentrationsgradient jedoch noch

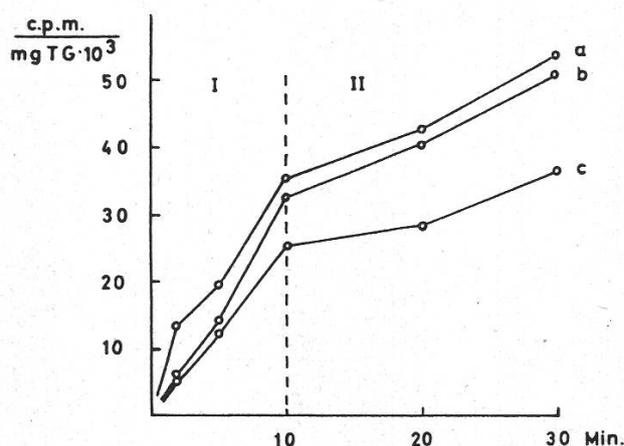


Abbildung 3

Absorption von 2-Aminoisobuttersäure- H^3 durch ganze Wurzeln als Funktion der Zeit. Jeder Punkt entspricht dem Aktivitätsgehalt von 10 gleichen Wurzelabschnitten, bezogen auf das Trockengewicht. a = 0-5 mm, b = 5-10 mm, c = 30-35 mm von der Spitze

deutlich vorhanden, der Zentralzylinder wies erst eine geringe Aktivität auf. Schon nach dieser kurzen Zeit waren in jungen Wurzelzonen nahe der Spitze ausser den Zellwänden auch Zytoplasma und Zellkerne deutlich markiert (Tafel 2, Abb. 8). In älteren Wurzelzonen, wo die Zellen bereits

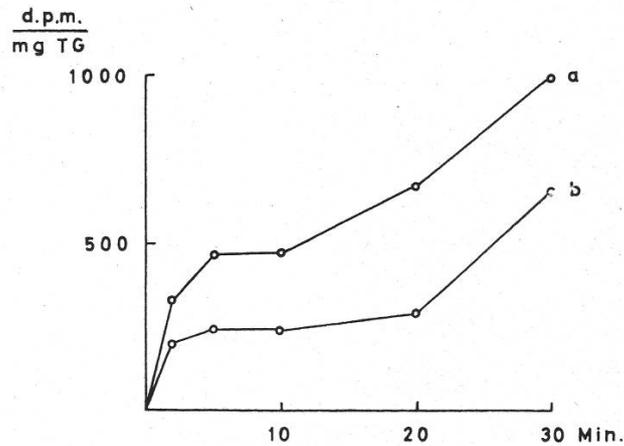


Abbildung 4

Absorption von L-Histidin-C¹⁴ durch ganze Wurzeln als Funktion der Zeit. Jeder Punkt entspricht dem Aktivitätsgehalt von 10 gleichen Wurzelabschnitten, bezogen auf das Trockengewicht. a = 0-5 mm, b = 30-35 mm von der Spitze

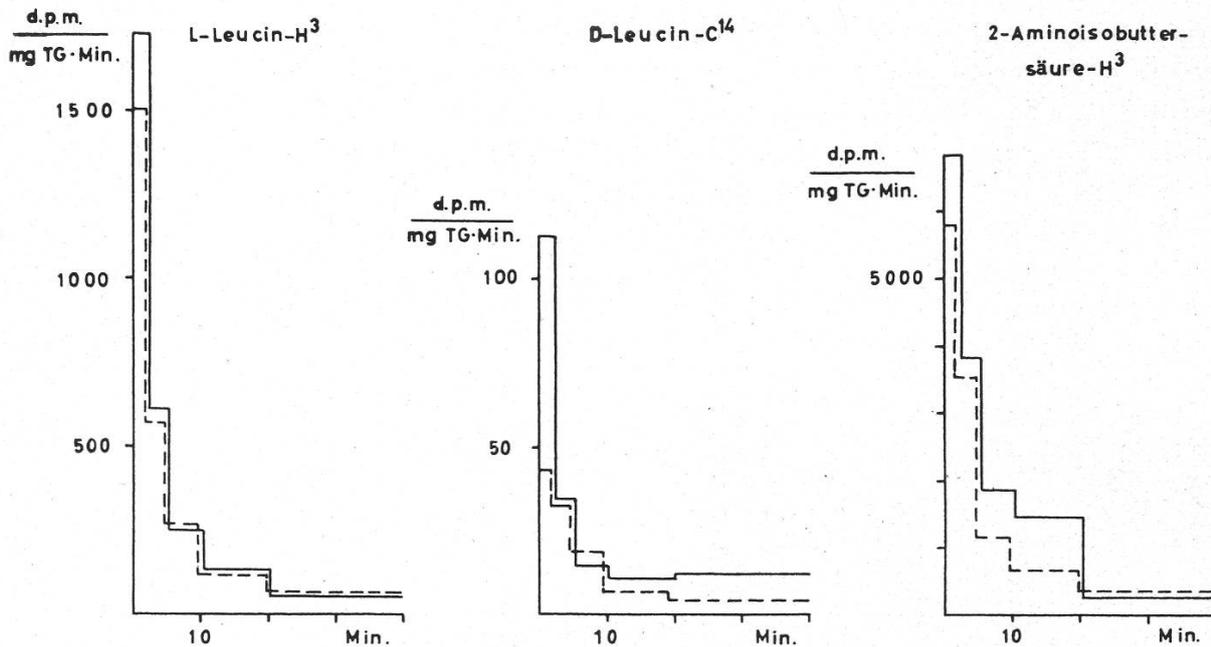


Abbildung 5

Austausch von Aminosäuren aus isolierten Wurzelstücken. Die Wurzelstücke wurden während 40 min bei 25 °C gefüttert, dann in Lösungen mit überschüssiger inaktiver Aminosäure von 0 °C übertragen. — = Stücke 0-5 mm, --- = Stücke 5-15 mm von der Wurzelspitze. Beim Vergleich der 3 Versuche muss berücksichtigt werden, dass gleichen dpm-Werten nicht gleiche Mengen Aminosäuren entsprechen

Zentralvakuolen aufwiesen, war die Beurteilung schwieriger, da das Zytoplasma den Wänden eng anliegt und eine sichere Unterscheidung zwischen Zellwand- und Zytoplasmaaktivität nicht mehr möglich ist (Tafel 2, Abb. 9).

In Abbildung 5 ist der Austauschverlauf von 2-Aminoisobuttersäure- H^3 , L-Leucin- H^3 und D-Leucin- C^{14} an isolierten Wurzelstücken dargestellt. Je 50 Wurzelstücke in einer Entfernung zwischen 0–5 und 5–15 mm von der Wurzelspitze wurden während 40 min gefüttert, in fließendem Wasser ganz kurz gespült und sofort für 2, 3, 5, 10 und 20 min in 20 ml überschüssige, inaktive Aminosäurelösung von 0 °C übertragen. Die Aktivität der Austauschlösungen wurde bestimmt und als Mass für den Austausch gewertet. Nach 5–10 min sank die Austauschrate auf einen kleinen Wert. Für 2-Aminoisobuttersäure- H^3 und für D-Leucin- C^{14} betrug die verbleibende Aktivität in den Wurzelabschnitten nach 40 min noch immer ungefähr $\frac{4}{5}$ der anfänglich absorbierten Aktivität, für L-Leucin wurde ein niedrigerer Wert, etwa $\frac{1}{2}$, erhalten.

2. Absorption von Aminosäuren in verschiedenen Längszonen der Wurzel

a) Qualitative Vergleiche zwischen verschiedenen Aminosäuren

Die in Abbildung 6 dargestellten Kurven über den Aktivitätsgehalt verschiedener Wurzelabschnitte sind für alle untersuchten Aminosäuren qualitativ gleichartig. Sie weisen ein Maximum zwischen 2–10 mm hinter der Wurzelspitze auf und fallen nachher bis zur Eintauchgrenze in die Isotopenlösung bei 40–50 mm ziemlich steil ab. Dieser Kurvenverlauf konnte unter anderen Bedingungen etwas verändert werden. Wurden um 1–2 Tage ältere oder im Wachstum etwas zurückgebliebene Wurzeln verwendet (etwa nach ausschliesslicher Keimung auf Filterpapier), verschoben sich die Maxima in die ersten 2 mm der Wurzelspitze (Abb. 7). In Abbildung 8 ist der Kurvenverlauf für L-Histidin- C^{14} nach 40 min Fütterung und anschliessender Übertragung in Nährlösung 1:10 nach Hoagland für weitere 16 h dargestellt. Die Zellen mit dem ursprünglichen Aktivitätsmaximum nach 40 min Fütterung liegen nach dem 16stündigen Wachstum in einer Zone zwischen 10–30 mm von der Spitze entfernt. Sie sind immer noch erhöht aktiv. Zwischen 0–2 mm von der Wurzelspitze bildete sich indessen ein neuer Gipfel. Mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 ergab sich ein ähnliches Ergebnis.

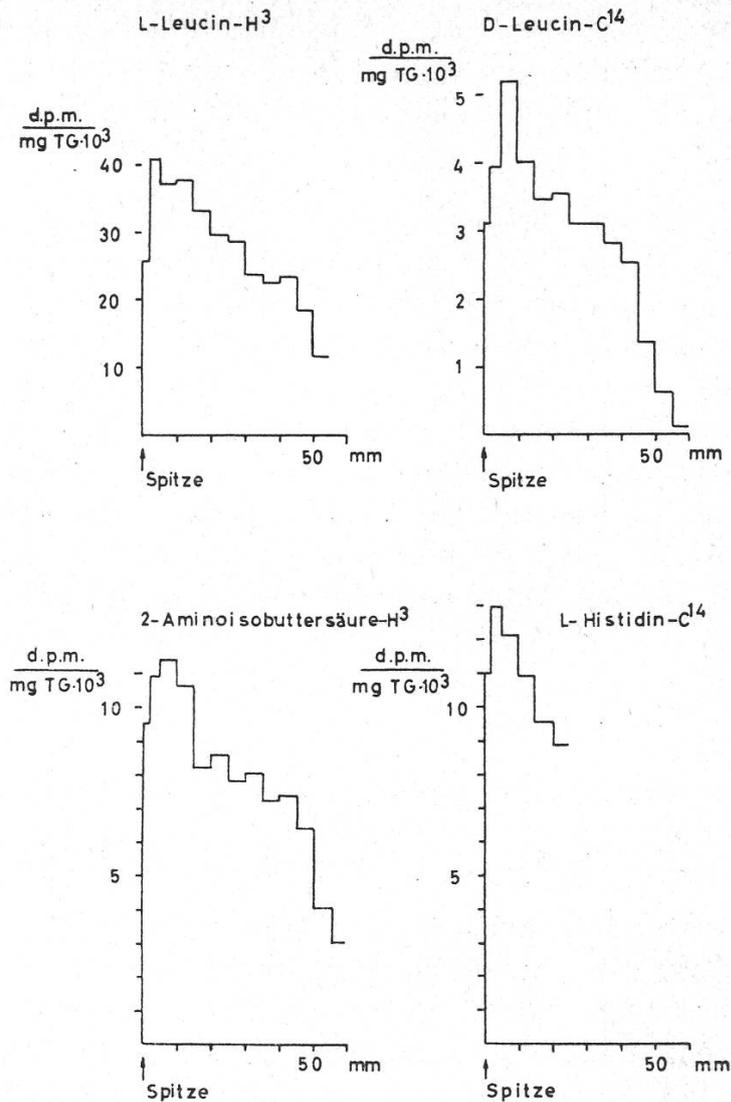


Abbildung 6

Absorption in verschiedenen Längszonen der Wurzel. Pro Versuch wurden 25 ganze Pflanzen während 60 min über die untersten 40 mm der Wurzeln gefüttert. Beim Vergleich der 4 Kurven muss berücksichtigt werden, dass gleichen dpm-Werten nicht gleiche Mengen von Aminosäuren entsprechen

b) Bedeutung der Wurzelhaare

In der Regel waren die verwendeten, 4–5 Tage alten, in verdünnter Nährlösung gewachsenen Pflanzen ohne Wurzelhaare. Um Wurzelhaare zu erzielen, wurden die Samen bis zur Verwendung der Keimlinge auf feuchtem Filterpapier gekeimt. In Abbildung 9 ist ein Absorptionsversuch mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 und Wurzeln mit reichlicher Haarbildung dargestellt. Die Kontrolle ist in Abbildung 7 zu finden. Während bei der Kontrolle die Aktivität von der Wurzelspitze weg gleichmässig abfällt, steigen die Werte in Abbildung 9 im Bereich der Wurzelhaarregion wieder etwas an. In autoradiographischen Untersuchungen konnte bei

allen Aminosäuren eine kräftige Markierung der Wurzelhaarzellen beobachtet werden. Subepidermale Zellen waren aber nicht weniger aktiv (Tafel 3, Abb. 10). Für 2-Aminoisobuttersäure konnte noch folgende Beobachtung gemacht werden: Wurden vor der Exposition die mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 markierten Schnitte ausgewaschen, zeigte der ganze Wurzelquerschnitt praktisch keine Aktivität, während die Wurzelhaare schwach, jedoch deutlich aktiv waren.

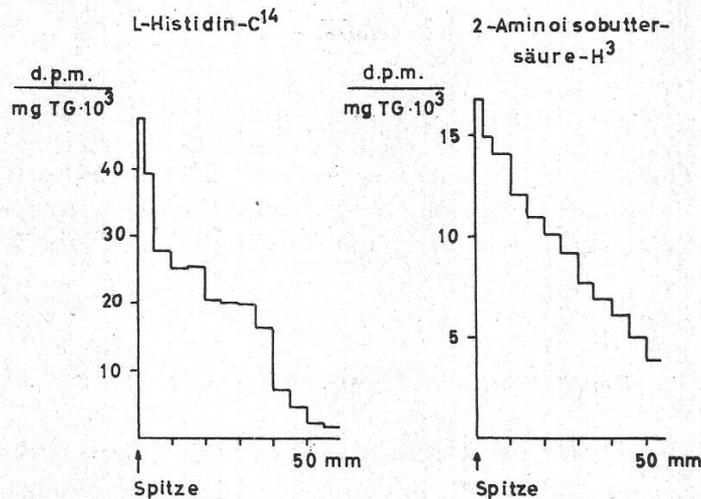


Abbildung 7

Absorption in verschiedenen Längszonen der Wurzel bei langsam gekeimten Pflanzen. Aktivität von L-Histidin- C^{14} $1 \mu\text{c/ml}$, spez. Aktivität 35 mc/ml , sonst gleiche Versuchsanordnung wie in Abbildung 6. Die Maxima sind in die ersten Millimeter der Wurzelspitze verschoben

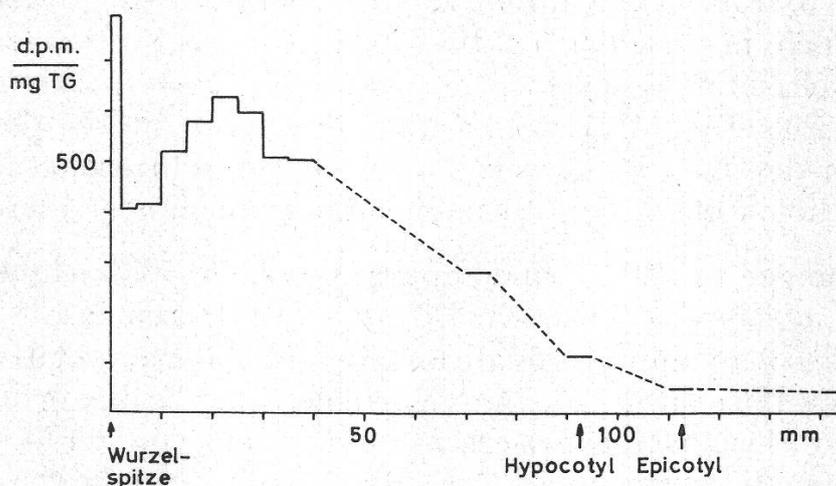


Abbildung 8

Aktivitätsverteilung in 25 6 Tage alten Pflanzen nach 40 min Fütterung mit L-Histidin- C^{14} und anschliessend erfolgter Inkubation in inaktiver Nährlösung 1:10 für 16 h

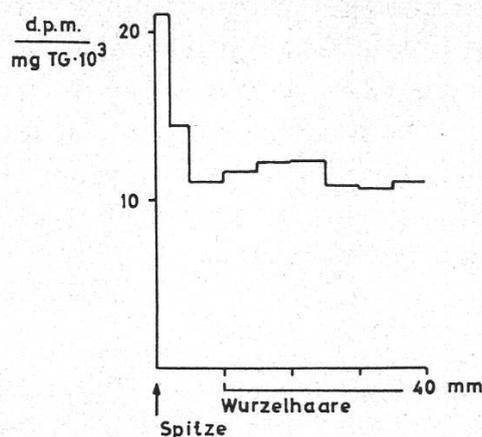


Abbildung 9

Bedeutung der Wurzelhaare für die Absorption von 2-Aminoisobuttersäure- H^3 . Aufgezeichnet ist die Aktivität von 25 Wurzeln mit gut entwickelten Wurzelhaaren nach 60 min Fütterung. Die Kontrolle findet sich in Abbildung 7

3. Verteilung der absorbierten Aminosäuren auf verschiedene Gewebe

Für diese Untersuchungen wurden von 5 Tage alten, intakten Pflanzen, die über die ganze Wurzel gefüttert wurden, Mikroautoradiographien hergestellt. In jungen Wurzelzonen nahe der Spitze wies das Plerom eine gleichmässig verteilte und zugleich höhere Aktivität auf als das Periblem, dessen Aktivität ebenfalls gleichmässig verteilt war. In etwas älteren Zonen war die Aktivitätsverteilung differenzierter. Die Rinde wies weiterhin eine gleichmässige Markierung auf. Im Übergang zum Zentralzylinder, vornehmlich im Perizykel und in den umliegenden Parenchymzellen, waren bei allen Aminosäuren regelmässig die höchsten Aktivitäten zu finden (Tafel 3, Abb. 11). Während das Phloem im Vergleich zum umgebenden Parenchym etwa gleich aktiv war, wiesen das Protoxylem und vor allem die weiten Metaxylemzellen sogar schwächere Aktivitäten auf. Wenn hohe Fütterungsaktivitäten gewählt wurden, waren die äusseren Zellschichten des Kalyptragewebes nach 60 min Fütterungsdauer hoch aktiv, sogar höher als das darüberstehende Periblem oder Plerom.

In Abbildungen 10 und 11 sind Zählergebnisse aus Wurzelquerschnitts-Autoradiographien von L-Leucin- H^3 und von D-Leucin- C^{14} graphisch dargestellt. Die Auszählung erfolgte an feinkörnigen Photoplatten (Kodak Typ 1060). Als Mass für die Aktivität einzelner Gewebe diente die erzeugte Kornzahl pro Flächeneinheit. Zwischen 10–50 mm von der Wurzelspitze veränderte sich die relative Verteilung der Aktivität auf die verschiedenen Gewebe sowohl für L- als auch für D-Leucin nicht wesentlich, während die Gesamtaktivität (wie auch anhand der quantitativen Aktivitätsbestimmungen bereits dargestellt wurde) in basaler Richtung absinkt. Ent-

sprechende Befunde ergaben sich mit L-Histidin-C¹⁴ und 2-Aminoisobuttersäure-H³.

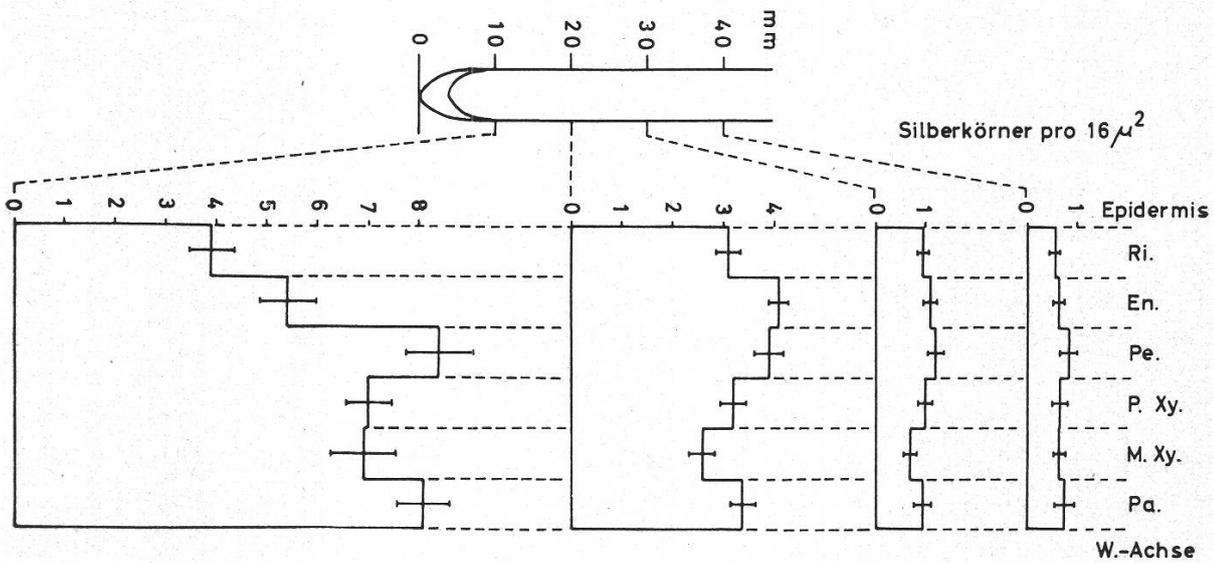


Abbildung 10

Graphische Darstellung der Silberkornzählungen von einer autoradiographierten Wurzel aus verschiedenen Längszonen. Fütterung mit L-Leucin-H³ während 300 min über die ganze Wurzel. Ausgezählt wurden pro Wurzelzone immer an 2 verschiedenen Querschnitten zusammen 40 Zählquadrate zu 16 µ² für jedes der dargestellten Gewebe. Aufgezeichnet ist das berechnete Mittel. Ri. = Rinde, En. = Endodermis, Pe. = Perizykel, P. Xy. = Proxylem, M. Xy. = Metaxylem, Pa. = Parenchym des Zentralzylinders

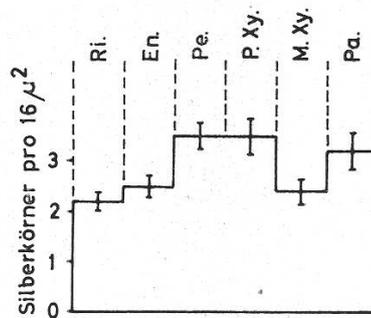


Abbildung 11

Graphische Darstellung der Silberkornzählungen von einer autoradiographierten Wurzel 10 mm von der Wurzelspitze. Fütterung mit D-Leucin-H³ während 300 min, gleiche Auswertung wie in Abbildung 10

4. Absorption und Fixierung der Aminosäuren

a) Qualitative Untersuchungen an Autoradiographiepräparaten

Ausgewaschene Schnitte von mit L-Histidin-C¹⁴ oder mit L-Leucin-H³ gefütterten Wurzeln wiesen zwischen 10–40 mm von der Wurzelspitze

eine ähnliche relative Aktivitätsverteilung auf wie nicht ausgewaschene Präparate, ebenfalls mit einem Aktivitätsmaximum im Übergang zum Zentralzylinder (Tafel 3, Abb. 12). Oft erschienen Epidermis und die angrenzenden Rindenzellen etwas stärker markiert als die tiefer liegenden Rindenschichten. In Tafel 3, Abbildung 13, ist die Autoradiographie einer mit L-Leucin- H^3 gefütterten Wurzelspitze abgebildet. Die Initialen weisen eine erhöhte Aktivität auf, während unmittelbar darüber eine Zone mit niedriger Aktivität, das Ruhezentrum der Proteinsynthese (Cloves, 1958), zu sehen ist.

Während ausgewaschene Schnitte von 2-Aminoisobuttersäure- H^3 in Mikroautoradiographien praktisch inaktiv waren, zeigten solche von D-Leucin- H^3 nach Auswaschung starke Gewebeaktivitäten an und waren mit Autoradiographien von L-Leucin- H^3 durchaus vergleichbar. Diese Ergebnisse konnten mit D-Leucin- C^{14} geprüft und bestätigt werden (Tafel 3, Abb. 14). Auch sprossende Seitenwurzeln, deren Mutterwurzel mit L- oder D-Leucin gefüttert wurde, waren nach Auswaschung in beiden Fällen noch kräftig aktiv (Tafel 3, Abb. 15 und 16).

b) Quantitative Untersuchungen

Aufgrund der qualitativen Ergebnisse mit Autoradiographien von L- und D-Leucin war es wünschenswert, auch quantitative Angaben über lösliche und unlösliche Anteile geben zu können.

Von 5 Tage alten, in Petrischalen steril gekeimten Pflänzchen wurden unter sterilen Bedingungen (Impfkammer) Wurzelstücke von 0–5 und von 5–15 mm von der Wurzelspitze geschnitten und nach nochmaligem Spülen in sterilem Wasser in Einheiten zu 50 Stück zur Fütterung verwendet. Für jede Fütterung wurden 10 ml sterile Lösung gebraucht, die 10^{-3} molaren Phosphatpuffer pH 6,2 und den Tracer enthielt.

Mit Hilfe von internen Standards wurden die dpm pro ml Fütterungslösung im Flüssigkeits-Scintillationsspektrometer bestimmt. Da gleichzeitig auch die Konzentration von Leucin bekannt war, konnte bei der Auswertung der Versuchsergebnisse von dpm leicht auch auf mg Leucin umgerechnet werden.

Nach 40 min Fütterungsdauer war ein Einbau weder von L- noch von D-Leucin erfassbar (Tab. 3, A). Dabei wurde etwa doppelt soviel L- als D-Leucin absorbiert. Die leicht negativen Werte, die sich für den unlöslichen Anteil ergaben, rühren wohl daher, dass die alkoholischen Gewebesuspensionen vor ihrer Klärung warm pipettiert werden mussten, während die Proben von den geklärten Extrakten kalt entnommen wurden und sich so geringe Konzentrationsdifferenzen ergaben.

Eine weitere Serie von Wurzelstücken wurde nach 40 min Fütterungsdauer für 260 min in inaktiver Phosphatpufferlösung pH 6,2 inkubiert und erst dann ausgewertet (Tab. 3, B). Der unlösliche Aktivitätsanteil von L-Leucin lag nach dieser Zeit unter 10%, derjenige von D-Leucin dagegen zwischen 25 und 30% der noch enthaltenen totalen Gewebeaktivität. Die Versuche in Tabelle 3 unter A und B wurden zu verschiedenen Zeiten und dadurch mit etwas anderem Pflanzenmaterial durchgeführt. Die Aktivitätsverluste an die Inkubationslösung waren bei L-Leucin relativ wie absolut höher als bei D-Leucin.

Der Versuch wurde mit L- und D-Leucin wiederholt, wobei der inaktiven Inkubationslösung in einem Fall 0,5% Glucose zugesetzt, in einem

Tabelle 3

Absorption und Fixierung von L-Leucin- H^3 und D-Leucin- C^{14} durch isolierte Wurzelstücke
A: Nach 40 min Fütterungsdauer

B: Nach 40 min Fütterungsdauer und anschliessender Inkubation in inaktiver Lösung während 260 min

Erklärungen siehe Text

	Isotop	Wurzelstücke Distanz von Wurzelspitze mm	Aktivität von 0,5 ml Gewebesuspension dpm $\cdot 10^{-2}$	Aktivität von 0,5 ml geklärter Lösung dpm $\cdot 10^{-2}$	Unlöslicher Anteil %	Gesamtaktivität von 50 Wurzelstücken		Verlust an Inkubationslösung	
						dpm $\cdot 10^{-3}$	mg $\cdot 10^3$	dpm $\cdot 10^{-3}$	mg $\cdot 10^3$
A	L-Leucin- H^3	0-5	61,6	64,4	-2,9	249,6	6,5	—	—
			63,2	64,1					
	5-15	80,7	84,2	-4,8	318,4	8,3	—	—	
		78,4	82,5						
D-Leucin- C^{14}	0-5	11,7	11,8	-0,85	46,8	3,4	—	—	
		11,7	11,8						
5-15	16,0	16,2	-0,35	65,6	4,7	—	—		
	16,8	16,7							
B	L-Leucin- H^3	0-5	53,7	50,9	+2,6	213,0	5,5	160	4,2
			52,8	52,7					
	5-15	78,6	72,4	+8,3	312,4	8,1	238	6,2	
		77,7	70,8						
D-Leucin- C^{14}	0-5	76,7	56,9	+27	30,5	2,2	11,6	0,84	
		75,9	54,8						
5-15	84,5	61,6	+29	34,4	2,5	17,0	1,2		
	87,9	61,7							

ändern als Fütterungslösung und als Inkubationslösung 1:10 verdünnte Nährlösung nach Hoagland, pH 5,0, verwendet wurde. Im zweiten Fall war die Leucin-Konzentration der Fütterungslösung gleichzeitig niedriger. Stets war ein beträchtlicher Anteil von D-Leucin, in einzelnen Proben bis über 40%, nicht aus dem Gewebe auswaschbar. Der unlösliche Anteil von L-Leucin war immer relativ niedriger als derjenige von D-Leucin. Anhand eines weiteren Versuches wurde mit zwei verschiedenen Konzentrationen von L-Leucin- H^3 geprüft, ob das Zerschneiden der Wurzeln vor Versuchsbeginn auf Absorption und Fixierung einen wesentlichen Einfluss habe. Je 20 intakte, 5 Tage alte, nichtsterile Pflanzen wurden 40 min in Nährlösung nach Hoagland 1:10 verdünnt bei pH 5,0 gefüttert und anschliessend für 260 min in inaktiver Nährlösung inkubiert. Dasselbe geschah mit je 50 Wurzelstücken von 0–5 und von 5–15 mm von der Wurzelspitze entfernt für beide Konzentrationen.

Tabelle 4

Absorption und Fixierung von L-Leucin- H^3 durch intakte und isolierte Wurzelstücke bei 2 verschiedenen Konzentrationen

Konzentration A: 0,75 $\mu\text{c}/\text{ml}$, spez. Aktivität 3,9 mc/mM

Konzentration B: 0,75 $\mu\text{c}/\text{ml}$, spez. Aktivität 8,2 c/mM

Fütterungsweise	Konzentration	Ausgewertete Wurzelzonen Distanz von Wurzelspitze mm	Aktivität von 0,5 ml Gewebesuspension $\text{dpm} \cdot 10^{-2}$	Aktivität von 0,5 ml geklärter Lösung $\text{dpm} \cdot 10^{-2}$	Unlöslicher Anteil %	Gesamtaktivität pro mg TG $\text{dpm} \cdot 10^{-2}$	
20 intakte Pflanzen über Wurzeln 0–40 mm	A	0–5	16,7 16,3	13,6 14,4	15	59,8	
		5–15	20,0 19,5	18,6 18,9	5,1	57,8	
	B	0–5	38,4 38,7	31,1 32,4	18	114	
		5–15	65,6 70,6	49,7 48,8	28	213	
	Über je 50 isolierte Wurzelstücke (0–5 und 5–15 mm von der Wurzelspitze)	A	0–5	40,4 40,6	33,6 33,7	17	57,6
			5–15	48,3 49,2	38,1 37,9	22	69,8
B		0–5	110 109	86,3 83,2	19	154	
		5–15	109 118	84,8 84,6	25	139	

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tabelle 4 dargestellt. Sowohl bezüglich Absorption als auch bezüglich unlöslichen Anteils ergaben sich keine augenfälligen Differenzen. Ein Absorptionsversuch mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 an zerschnittenen und an ganzen Wurzeln ergab für die untersuchten apikalen 15 mm ein entsprechendes Resultat, indem sich der Aktivitätsgehalt der Wurzelteile von intakt gefütterten Wurzeln kaum von jenem der isoliert gefütterten Wurzelteile unterschied.

c) $C^{14}O_2$ -Produktion aus D-Leucin-1- C^{14}

Aufgrund des hohen unlöslichen Anteils von D-Leucin im Wurzelgewebe wurde vermutet, dass D-Leucin einer Assimilation zugänglich sein könnte. Die Produktion von $C^{14}O_2$ aus gefüttertem D-Leucin-1- C^{14} wäre damit wahrscheinlich oder doch möglich. In einigen Versuchen wurde deshalb die zugeführte Belüftungsluft nach Durchperlen der Fütterungs- bzw. Inkubationslösung in 20% KOH geleitet und die Aktivität direkt bestimmt, indem 0,5 ml der KOH-Lösung in 15 ml Toluol-Äthanol-Zählflüssigkeit gelöst und gezählt wurden. Als Kontrolle diente 20% KOH, durch das während gleich langer Zeit Aussenluft strömte. Die Untersuchung an ganzen Pflanzen erfolgte nicht unter sterilen Bedingungen.

Tabelle 5

$C^{14}O_2$ -Produktion durch *Zea mays* nach Fütterung mit D-Leucin-1- C^{14}

I. Absorption von $C^{14}O_2$ durch KOH während der Inkubation in inaktiver Nährlösung nach Hoagland, 1:10 verdünnt, pH 5,0

II. Absorption von $C^{14}O_2$ durch KOH während Fütterung und anschliessender Inkubation in inaktiver Phosphatpufferlösung, pH 6,2. Die Bestimmung der Aktivität in KOH erfolgte alle 60 min, angegeben ist die Gesamtaktivität nach 300 min

	Fütterungsweise	Ausgewertete Wurzelzonen Distanz von Wurzelspitze mm	Fütterungsdauer min	Dauer der CO_2 -Absorption min	Aktivität in KOH total dpm · 10 ⁻²	Aktivität der Wurzelstücke dpm · 10 ⁻²	KOH-Aktivität in % der Wurzelaktivität
I.	20 intakte Pflanzen über Wurzeln 0-40 mm	—	120	300	317	—	—
II.	Über je 50 isolierte Wurzelstücke (0-5 und 5-15 mm von der Wurzelspitze)	0-5	40	300	10,9	305	3,6
		5-15	40	300	20,3	344	5,9

Die verwendeten Lösungen waren jedoch zu Versuchsbeginn steril, und mikroskopische Untersuchungen der Wurzeln liessen keinen wesentlichen Befall von Bakterien oder Pilzen erkennen. Die Untersuchungen an isolierten Wurzelstücken wurden an steril gezogenen Wurzeln und mit sterilen Lösungen durchgeführt. In beiden Untersuchungen waren die KOH-Lösungen deutlich aktiv (Tab. 5).

5. Ferntransport

Wenn Wurzelspitzen nur in den ersten 10 mm gefüttert wurden, so konnten in Mikroautoradiographien in dahinter liegenden Zonen nur geringe Aktivitäten festgestellt werden. Die Verteilung erfolgte dabei über alle Gewebe ziemlich gleichmässig. Junge Seitenwurzeln wiesen jedoch nach längerer Fütterung der mütterlichen Wurzelspitze eine kräftige Markierung auf (Tafel 3, Abb. 15). Ein Transport hatte hier also in entferntere Regionen stattgefunden. Auch unnatürliche Aminosäuren, wie D-Leucin und 2-Aminoisobuttersäure, wurden in ähnlicher Weise wie natürliche Säuren in Seitenwurzeln akkumuliert (Tafel 3, Abb. 16 und 17).

Auch bei Wurzeln, die zur Fütterung bis zu 50 mm in die Isotopenlösung eingetaucht waren, gelang es nicht, im eingetauchten Bereich oder ausserhalb davon im Xylem oder Phloem Aktivitäten nachzuweisen, die wesentlich über den benachbarten Geweben gelegen hätten. Die Leitgewebe waren in den untersuchten Zonen allerdings noch recht jung. Ältere Wurzelteile wurden weniger untersucht, da Schnitte schlechtere Kontakteigenschaften gegenüber der Photoemulsion zeigten und damit weniger zuverlässige Ergebnisse erzielt werden konnten.

In Untersuchungen über die Absorption von Aminosäuren in verschiedenen Längszonen der Wurzeln wurde nach Fütterung von intakten Pflanzen jeweils auch die Aktivität von Sprossbasis und Sprossspitze im Flüssigkeits-Scintillationsspektrometer bestimmt. Die Zählzelle für die ergrünenden Sprosssteile sank für H^3 allerdings unter 10%. Bei allen Aminosäuren waren die Sprosse nach 60 min bereits deutlich aktiv. Die Aktivitäten lagen nach dieser Zeit zwischen 0,1–3% der Wurzelspitzenaktivität.

Interessante Ergebnisse zur Frage, durch welche Transportbahnen die Aminosäuren beim Ferntransport von der Wurzel in den Spross geleitet werden, konnten durch mikroautoradiographische Untersuchungen an Sprossen gewonnen werden. 2-Aminoisobuttersäure- H^3 und L-Leucin- H^3 , die in hohen spezifischen Aktivitäten zur Verfügung standen, wurden 5 Tage alten Pflanzen während 50–60 min appliziert. Alsdann wurden die Sprosse gefriergetrocknet, Querschnitte hergestellt und autoradiographiert.

Nach Fütterung der Wurzel mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 war im Epicotyl das Xylem stärker aktiv als umliegendes Gewebe (Tafel 4, Abb. 18 und 19), gleichzeitig konnten jedoch auch im Phloem höhere Aktivitäten festgestellt werden. Mit L-Leucin- H^3 waren die Schwärzungen geringer und damit die Beurteilung etwas schwieriger. Stärkere Aktivitäten konnten ebenfalls in parenchymatischen Zellen im Bereiche des Phloems lokalisiert werden.

In der Coleoptile war das Phloem nach Fütterung der Wurzel mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 stets stark markiert, das Xylem stets wesentlich schwächer, jedoch noch immer stärker als die dem Leitbündel nicht zugehörigen Gewebe (Tafel 4, Abb. 20). Vereinzelte Tracheiden erreichten ebenfalls den Aktivitätsgrad des Phloems (Tafel 4, Abb. 21) und konnten wie das Phloem über ganze Schnittserien in gleichbleibender Aktivität verfolgt werden. In den wesentlich schwächer aktiven Autoradiographien von L-Leucin- H^3 erschien meist das Xylem etwas stärker markiert als das Phloem.

In Autoradiographien von ganzen Sprossquerschnitten wurde die Aktivitätsverteilung von 2-Aminoisobuttersäure- H^3 zwischen älteren und jüngeren Blättern untersucht. Die äusseren und auch älteren Blätter waren am aktivsten, gegen die innersten und jüngsten Anlagen zu fiel die Aktivität ab (Tafel 4, Abb. 22). Das noch sehr junge Phloem der Blätter erschien regelmässig deutlich markiert (Tafel 4, Abb. 23 und 24).

IV. Besprechung der Ergebnisse

Die Besetzung des FS erfolgt aufgrund der vorliegenden Absorptionsversuche innerhalb der ersten 10 min. Die nachfolgende zweite Phase der Absorption dürfte bei *Zea mays* durch aktive Vorgänge (up hill) verlaufen. Wären vorwiegend Austauschvorgänge beteiligt, wie z. B. Oxender et al. (1963) von Leucin und anderen neutralen Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten bei «Ehrlich-Tumorzellen» berichten, so müssten die absorbierten Aminosäuren – soweit sie nicht durch Einbau in Proteine oder anderweitige chemische Bindung fixiert werden – auch wieder austauschbar sein. Heinz (1961) argumentiert überzeugend gegen eine nur lose endergonische Bindung von Aminosäuren an intrazelluläres Material. Zahlreiche Phänomene wurden auch bei Mikroorganismen beschrieben, die dafür sprechen, dass die angereicherten Aminosäuren im Innern der Zellen grösstenteils frei gelöst sind (Magasanik, 1957). Die austauschbaren Mengen entsprachen in den durchgeführten Austauschversuchen bei weitem nicht den absorbierten Gesamtmengen. Da sowohl Leucin als auch 2-Aminoisobuttersäure nach 40 min Absorptionsdauer aus abgetötetem Gewebe praktisch vollständig extrahiert werden konnten, kann

eine Verminderung des Austauschs infolge von Einbau eines Teils der Aminosäuren in Zellbestandteile ausgeschlossen werden.

Durch Interpolation der beiden Kurvenabschnitte I und II in Abbildung 3 ergibt sich, dass nach 10 min mindestens noch $\frac{4}{5}$ der absorbierten Aktivität FS-Aktivität sein müssen. In Autoradiographien von Wurzeln, die unter gleichen Bedingungen weniger als 10 min gefüttert wurden, muss folglich ebenfalls der grösste Teil der Schwärzungen aus dem FS erzeugt worden sein. In solchen Autoradiographien lässt sich somit die Lage des FS abschätzen. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass sich der FS nicht nur auf die Zellwandräume zu beschränken scheint.

Die zuweilen hohe Aktivität der peripheren Kalyptrazellen, die sich vor allem bei hohen Fütterungskonzentrationen zeigte, kann so erklärt werden, dass die verschleimenden Wurzelzellen von der Aussenlösung durchtränkt wurden.

Für den Quertransport durch die Wurzeln während der Absorption bestehen zwei Möglichkeiten:

- a) passiv durch den FS;
- b) aktiv von Zelle zu Zelle über die Plasmadesmata.

Nach 5 min Absorptionsdauer dringt 2-Aminoisobuttersäure bereits in den Zentralzylinder vor. Ein Aktivitätsgradient von der Epidermis zum Zentralzylinder ist aber in den Autoradiographien noch deutlich zu erkennen. Da es sich dabei grösstenteils um Aktivität im FS handelt, ist es wahrscheinlich, dass der Eintransport in erster Linie durch die FS-Räume und nicht aktiv vor sich geht. Erst aus dem FS dürfte aktiver Transport in die einzelnen Zellen und schliesslich auch von Zelle zu Zelle stattfinden.

Da der Aminosäurenachstrom in den FS aufgrund der Absorptionskurven (Abb. 3 und 4) offenbar rascher erfolgt, als die Zellen durch aktiven Transport aufnehmen können, muss man annehmen, dass die Absorptionsleistung der Wurzel für gelöste Aminosäuren nicht in erster Linie von ihrer äusseren, sondern vielmehr von ihrer inneren Oberfläche, d.h. von der Summe aller absorbierenden Zytoplasmaflächen abhängig ist. Eine Wurzel vergrössert ihre äussere Oberfläche durch guten Wurzelhaarbesatz um ein Mehrfaches. Sofern eine Abhängigkeit von der äusseren Oberfläche bestehen würde, müsste ein Vergleich der Absorptionsleistung von Wurzeln mit und ohne Wurzelhaare zu entsprechenden Differenzen führen. In den durchgeführten Versuchen war eine geringe Steigerung der Absorption von Aminosäuren im Bereich der Wurzelhaarzone wohl zu beobachten, sie entsprach jedoch der äusseren Oberflächenvergrösserung, bedingt durch die Wurzelhaare, bei weitem nicht. Dies bedeutet wiederum

nicht, dass die Wurzelhaare bei der Absorption aus dem Boden, wo doch wesentlich andere Verhältnisse als in einer Lösung herrschen, keine Bedeutung hätten. Schon der Umstand, dass Keimlinge von *Zea mays* in Nährlösung Wurzeln ohne Haare, Keimlinge auf Filterpapier dagegen Wurzeln mit Haaren treiben, ist auffallend; ebenso dass mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 gefütterte Wurzelhaare nach Auswaschung im Gegensatz zum übrigen Wurzelgewebe noch schwache Aktivitäten enthielten.

Bemerkenswert ist das hohe Absorptions- und Speichervermögen von Zonen nahe der Wurzelspitze sowohl für Protein- als auch für Nichtproteinaminosäuren sowie der Umstand, dass von da wenig Aufwärtstransport erfolgt. Der Befund, dass das Maximum der Aktivität bei intensiv wachsenden Wurzeln basaler liegt als bei langsam wachsenden Wurzeln, ist wohl morphologisch bedingt. Bei langsam wachsenden Wurzeln sind Streckungs- und Differenzierungszonen weniger ausgedehnt und liegen damit näher bei der Spitze. Fällt nun das Aktivitätsmaximum in eine dieser Zonen, kommt es zu der beobachteten Verschiebung. Die Aktivitätsgehalte in Abbildung 6 sind zumindest in den ersten 15 mm der Wurzel auch dem Absorptionsvermögen proportional. Dies ergibt sich daraus, dass in den Absorptionsversuchen mit abgeschnittenen Wurzelstücken ziemlich gleiche Werte erhalten wurden wie mit intakten Pflanzen. Eine wesentliche Veränderung der Aktivitätsverteilung infolge von Längstransport in der einen oder der andern Richtung konnte somit nicht erfolgt sein.

Wiebe und Kramer (1954) stellten für verschiedene Salze bei Gerstenwurzeln von den ersten 5 mm ebenfalls einen geringen Aufwärtstransport fest und führten die Akkumulation von Salzen nahe der Wurzelspitze auf die hohe Stoffwechselaktivität in dieser Region und auf das Fehlen von Leitgeweben zurück. Brouwer (1954) fand in Übereinstimmung zu Wiebe und Kramer, dass nach Fütterung der Wurzelspitzen von *Vicia faba* mit Phosphat wenig oder kein Transport in basälere Zonen erfolgt.

Die hohe Absorptionsfähigkeit junger Wurzelteile scheint für verschiedenste Stoffe vorhanden zu sein, wobei es nicht von Bedeutung ist, ob die akkumulierten Substanzen im Stoffwechsel gebraucht werden oder nicht, wie am Beispiel von 2-Aminoisobuttersäure zu sehen ist. In diesem Zusammenhang darf auf die Arbeit von Mothes (1960) hingewiesen werden, in der die attraktiven und akkumulativen Kräfte als ein generelles Charakteristikum für «Jugendlichkeit» aufgefasst werden. Engelbrecht (1961) stellte auch in Blättern von *Nicotiana* fest, dass neben natürlichen Aminosäuren 2-Aminoisobuttersäure akkumuliert wird. Eine sprossende Seitenwurzel, der das Charakteristikum für «Jugendlichkeit» sicher in hohem Masse zukommt, müsste also ein neues Konkurrenzverhältnis zur

mütterlichen Wurzelspitze auslösen. In der Tat konnten in den vorliegenden Untersuchungen nach Fütterung der Wurzelspitze mit Aminosäuren in relativ weit entfernten Seitenwurzelnanlagen, nicht aber im umliegenden mütterlichen Gewebe, hohe Aktivitäten gefunden werden. Ähnlich können die Ergebnisse der Langzeitversuche gedeutet werden. Während des 16stündigen Wachstums nach Fütterung mit L-Histidin (Abb. 8) oder mit 2-Aminoisobuttersäure bildete die Wurzelspitze ein neues Zentrum, welches das frühere, nun älter gewordene, konkurrenziert.

In den Analysen über die Verteilung der Aktivitäten auf die verschiedenen Gewebe der Wurzel kommt ebenfalls zum Ausdruck, dass «jugendliche» Teile oder, um nach Wiege und Kramer (1954) zu sprechen, Teile mit hoher Stoffwechselaktivität wie Prokambium und später der Perizykel und benachbartes Parenchym die höchste Absorptionsfähigkeit besitzen. Dies gilt wiederum sowohl für Protein- als auch für Nichtproteinaminosäuren. Die Orte, wo Aminosäuren in hohem Masse absorbiert werden, sind zugleich auch potentielle Bereiche hohen Verbrauchs. Dies wird deutlich, wenn L-Histidin- oder L-Leucin-Autoradiographien von ausgewaschenen Schnitten mit solchen von nichtausgewaschenen verglichen werden. Die Fähigkeit, Aminosäuren zu akkumulieren, und die Fähigkeit, Eiweisse zu synthetisieren, sind irgendwie eng gekoppelt.

Die Resultate über Absorption von Protein- und von Nichtproteinaminosäuren in verschiedenen Längszonen der Wurzel und in verschiedenen Wurzelgeweben stimmen qualitativ dermassen gut überein, dass nichts darauf schliessen lässt, dass in der Wurzel die beiden Typen von Aminosäuren separiert und in verschiedene Transportbahnen gelenkt würden.

Birt und Hird (1956, 1958a, 1958b) geben für die Absorption von L- und D-Leucin durch Karottenscheiben recht uneinheitliche Werte an. In den eigenen Untersuchungen konnte für L-Leucin nach 40 min Fütterungszeit eine höhere Absorption als für D-Leucin festgestellt werden. Eine wenn auch breite Spezifität des Transportsystems für isomere Formen scheint bei *Zea mays* vorhanden zu sein.

Da bei gleichem Diffusionsvermögen, gleicher Löslichkeit und gleichen Ladungszuständen nicht anzunehmen ist, dass L-Leucin und D-Leucin in unterschiedlichen Mengen im FS vorhanden sind, müssen beide Isomere aus dem FS auch wieder in gleicher Menge herausdiffundieren. Dass die Verluste von L-Leucin an die Inkubationslösung bei 25 °C höher waren als diejenigen von D-Leucin (Tab. 3) zeigt, dass nicht nur Aktivität aus dem FS verlorenging.

Nicht zu erwarten war das Ergebnis, dass nach längerer Fütterungszeit oder auch nach kurzzeitiger Fütterung und anschliessender mehrstündiger

Inkubation in inaktiver Lösung grössere Anteile von D-Leucin, im Gegensatz zu 2-Aminoisobuttersäure, nicht aus dem Gewebe ausgewaschen oder extrahiert werden konnten. Dass das Gewebe den unlöslichen Anteil nicht bloss adsorbierte, geht daraus hervor, dass nach 40 min Fütterung noch praktisch alle Aktivität extrahierbar war, nicht mehr aber, wenn längere Fütterung oder nach 40 min Fütterung noch für einige Stunden Inkubation in inaktiver Lösung erfolgte. Stumpf (1951) beobachtete, dass D-Alanin in Gegenwart wässriger Extrakte von Limabohne-, Lupine-, Kürbis-, Erbsen- und Weizenkeimlingen, ferner auch von Kürbisblättern als ein aktiver Aminodonator funktioniert. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist es wohl denkbar, dass auch das absorbierte D-Leucin eine Transaminierung erfährt und damit einer Assimilation zugänglich ist. Auch der Umstand, dass während der Fütterung und der Inkubationszeit radioaktives CO_2 freigesetzt wurde, scheint dafür zu sprechen, dass D-Leucin in *Zea mays* stoffwechselphysiologisch nicht inert ist.

Arisz (1961) ist der Ansicht, dass sich Ionen ebenso leicht durch parenchymatische Zellen wie durch eigentliche Leitgewebe bewegen können und dass die Leitbündel für den Transport erst über grössere Distanzen wirkungsvoller werden. Dieses Bild passt gut zu den eigenen Ergebnissen mit Aminosäuren. In jungen Wurzeln waren Xylem und Phloem nie aktiver als umgebendes Gewebe. Im Spross hingegen wiesen sowohl das Phloem als auch zum Teil das Xylem hohe Aktivitäten auf. Es scheint, dass die Aminosäuren in der jungen Wurzel ziemlich gleichmässig durch alle Gewebeteile transportiert werden und dass erst gegen den Spross zu allmählich der Transport in den Leitbündeln überwiegt.

Die Tatsache, dass nach 50–60 min Fütterung der Wurzel mit 2-Aminoisobuttersäure das Phloem in Coleoptile und Blättern im Gegensatz zu den übrigen Geweben (ausgenommen einzelne Tracheiden der Coleoptile) stark markiert war, beweist nicht gerade, dass durch den Spross der Haupttransport im Phloem erfolgte, macht dies jedoch wahrscheinlich. Die Aktivität von Tracheiden der Coleoptile und vermehrt noch des Epicotyls weist auf einen gleichzeitigen, wenn auch schwächeren Xylemtransport hin. Auch nach Fütterung der Wurzel mit L-Leucin zeigten sich höhere Aktivitäten in beiden Leitgeweben, was einen Transport sowohl im Xylem als auch im Phloem wahrscheinlich macht. Die Art der Aktivitätsverteilung von 2-Aminoisobuttersäure in verschiedenen alte Blätter weist wiederum darauf hin, dass Organe mit hoher Stoffwechselaktivität, im vorliegenden Fall die sich differenzierenden und stark wachsenden mehr äusseren Blattanlagen, am stärksten akkumulieren. Die These, Phloemtransport für Protein-, jedoch Xylemtransport für Nichtproteinamino-säuren, kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungen wenigstens für *Zea mays* nicht angenommen werden. Transportvor-

gänge und damit auch der Austausch zwischen Wurzel und Spross sind von derart komplexer Natur und von so vielen inneren und äusseren Faktoren abhängig, dass die einfache Alternative eine zu grobe Betrachtungsweise ist.

V. Zusammenfassung

Absorptions- und Transportvorgänge in Wurzeln von *Zea mays* wurden mit Hilfe von C¹⁴- oder H³-markierten natürlichen und unnatürlichen Aminosäuren untersucht. Die Auswertung erfolgte auf mikroautoradiographischem Weg und durch Aktivitätsbestimmungen im Flüssigkeits-Scintillationsspektrometer.

1. Die erste Phase der Absorption von Aminosäuren, die Besetzung des «Free Space» (FS), erfolgt in wenigen Minuten. Wahrscheinlich sind am FS neben den Zellwandräumen auch zytoplasmatische Strukturen beteiligt. Zentral gelegene Wurzelgewebe werden aus der Aussenlösung in erster Linie über den FS mit Aminosäuren versorgt.
2. In Wurzelhaarzonen vergrössert sich die Absorption durch die Anwesenheit gut entwickelter Wurzelhaare relativ wenig. Die Grösse der Wurzeloberfläche scheint für die Absorption von Aminosäuren aus einer Lösung von untergeordneter Bedeutung zu sein.
3. Zonen nahe der Wurzelspitze weisen ein hohes Absorptions- und Speichervermögen sowohl für Protein- als auch für Nichtproteinamino-säuren auf. Aus diesen Zonen erfolgt nur geringer Abtransport. Ähnlich verhalten sich Seitenwurzelanlagen.
4. Innerhalb verschiedener Gewebe der gleichen Zone zeigen nach erfolgter Absorption von markierten Protein- oder auch von Nichtproteinamino-säuren das Prokambium, in älteren Wurzelteilen der Perizykel und benachbartes Parenchym die höchste Aktivität. Zonen mit hoher Stoffwechsellätigkeit und Zonen mit hohem Aminosäuregehalt fallen zusammen.

5. L-Leucin wird in höherer Rate als D-Leucin absorbiert. Eine wenn auch breite Spezifität des Transportsystems scheint vorhanden zu sein. D-Leucin lässt sich im Gegensatz zu 2-Aminoisobuttersäure nicht mehr vollständig aus dem Wurzelgewebe auswaschen oder extrahieren. Die Produktion von $C^{14}O_2$ nach Fütterung von D-Leucin-1- C^{14} kann festgestellt werden. D-Leucin, nicht aber 2-Aminoisobuttersäure, scheint assimiliert werden zu können.
6. In jungen Wurzelteilen sind Phloem und Xylem aufgrund von Autoradiographien nicht aktiver als die Nachbargewebe. Im Gegensatz dazu können im Spross nach kurzzeitiger Fütterung der Wurzel mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 oder mit L-Leucin- H^3 im Phloem und teilweise auch im Xylem regelmässig starke Aktivitäten gefunden werden, was darauf hinweist, dass für den Ferntransport beide Transportwege benutzt werden.

Die vorliegende Arbeit entstand unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Wanner am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich. Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Wanner herzlich für die stete Unterstützung und die wertvollen Anregungen.

Ebenfalls gedankt sei Herrn Prof. Dr. R. Bachofen für klärende Diskussionen in Fragen der Aktivitätsmessung.

Die Schweizer Kommission für Atomwissenschaft stellte die Mittel für die Beschaffung der radioaktiven Aminosäuren zur Verfügung. Ihr sei auch bestens gedankt.

Summary

The absorption and the transport of C^{14} - and H^3 - labeled amino acids, both natural and unnatural, in the roots of *Zea mays* was studied by means of microautoradiography and liquid scintillation counting methods.

1. The first phase of amino acid absorption, the occupation of the "Free Space" (FS), takes place in several minutes. It is probable that in addition to the cell wall cytoplasmic structures in the FS are also concerned. Centrally situated root tissue are first of all provided with amino acids from the external solution through the FS.
2. In the root hair region the absorption is relatively little increased by the presence of well-developed root hairs. The size of the root surface area appears to be of minor significance for the absorption of amino acids from a solution.
3. Zones near the root tip show a high absorption and storage ability for protein as well as nonprotein amino acids. From these zones only little transport takes place. The same phenomena hold true for primordia of lateral roots.
4. Among the different tissues of the same zone the procambium, and in older parts of the root the pericycle and the neighboring parenchyma show the highest activity from absorption of labeled protein or non-protein amino acids. Zones of high metabolic activity coincide with zones with high amino acid content.
5. L-leucine is absorbed at a higher rate than D-leucine. A specificity of the transport system (though wide) appears to be present. D-leucine in contrast to 2-amino isobutyric acid can not be completely washed or extracted from the root tissue. The production of $C^{14}O_2$ after the feeding of D-leucine-1- C^{14} can be detected. D-leucine, but not 2-amino isobutyric acid, appears to be assimilated.
6. In young root parts the phloem and xylem from autoradiograms are not more active than the neighboring tissue. In the shoot, on the other hand, uniformly strong activity can be detected in the phloem and also partly in the xylem after short-time feeding of the roots with 2-amino isobutyric acid- H^3 or with L-leucine- H^3 . It is very probable that for long-distance translocation both transport paths are involved.

Literaturverzeichnis

- Arisz W.H. 1961. Long-distance translocation in living tissues. Repr. from "Recent Advances in Botany", Section 11, 1220–1224, published by the University of Toronto Press.
- Birnbaum S.M., L. Levintow, R. B. Kingsley und J. P. Greenstein. 1952. Specificity of amino acid acylases. *J. Biol. Chem.* **194**, 455–470.
- Birt L.M. und F. J. R. Hird. 1956. The uptake of amino acids by carrot slices. *Biochem. J.* **64**, 305–311.
- und F. J. R. Hird. 1958a. The uptake and metabolism of amino acids by slices of carrot. *Biochem. J.* **70**, 277–286.
- und F. J. R. Hird. 1958b. Kinetic aspects of the uptake of amino acids by carrot tissue. *Biochem. J.* **70**, 286–292.
- Bollard E.G. 1956. Nitrogenous compounds in plant xylem sap. *Nature* **178**, 1189–1190.
- Branton D. und L. Jacobson. 1961. Freeze-drying of plant material. *Exp. Cell Res.* **22**, 559–568.
- und L. Jacobson. 1962. Dry, high resolution autoradiography. *Stain Tech.* **37**, 239–242.
- Brian P.W., Joyce M. Wright, J. Stubbs und Audrey M. Way. 1951. Uptake of antibiotic metabolites of soil microorganisms by plants. *Nature* **167**, 347–350.
- Brouwer R. 1954. The regulating influence of transpiration and suction tension on the water and salt uptake by the roots of intact *Vicia faba* plants. *Acta Bot. Neerl.* **3**, 264–312.
- Butler G.W. 1953. Ion uptake by young wheat plants. II. The "apparent free space" of wheat roots. *Physiol. Plant.* **6**, 617–635.
- Caro L.G. 1964. High-resolution autoradiography. In: D.M. Prescott (ed.), *Methods in cell physiology I*, 327–363. Academic Press, New York und London.
- Cloves F.A.L. 1958. Protein synthesis in root meristems. *J. Exp. Bot.* **9**, 229–238.
- Dainty J. und A. B. Hope. 1959. Ionic relations of cells of *Chara australis*. I. Ion exchange in the wall. *Aust. J. Biol. Sci.* **12**, 395–411.
- Die van J. 1961. Synthesis and translocation of glutamine and related substances in tomato plant. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch.* **C 64**, 375–382.
- 1963. Pathways of translocation and metabolic conversions of root-absorbed $C^{14}(U)$ L-glutamic acid in tomato plants. *Acta Bot. Neerl.* **12**, 269–280.
- El-Shishiny E.D.H. und M. A. Nossier. 1957a. The relation of optical form to the utilization of amino acids. I. Utilization of stereoisomeric forms of glutamic acid by carrot root discs. *Plant Physiol.* **32**, 360–364.
- und M. A. Nossier. 1957b. The relation of optical form to the utilization of amino acids. II. Utilization of stereoisomeric varieties of aspartic acid and asparagine by carrot root discs. *Plant Physiol.* **32**, 639–643.
- Engelbrecht L. 1961. Beiträge zum Problem der Akkumulation von Aminosäuren in Blatzellen. *Flora* **150**, 73–86.
- Epstein E. 1956. Mineral nutrition of plants: mechanisms of uptake and transport. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **7**, 1–24.
- Fodor P.J., V. E. Price und J. P. Greenstein. 1949. Preparation of L- and D-alanine by enzymatic resolution of acetyl-DL-alanine. *J. Biol. Chem.* **178**, 503–509.
- Frenzel B. 1961. Modellversuche zur Klärung einiger Probleme der Abgabe von Aminoverbindungen durch die Wurzeln höherer Pflanzen im Boden. *Planta* **57**, 444–454.

- Greenstein J.P., J.B.Gilbert und P.J.Fodor. 1950. Enzymatic resolution of racemic lysine, norleucine, norvaline, and α -aminobutyric acid. *J. Biol. Chem.* **182**, 451–456.
- L.Levintow, C.G.Baker und J. White. 1951. Preparation of the four stereoisomers of isoleucine. *J. Biol. Chem.* **188**, 647–663.
- 1957. Resolution of DL mixtures of α -amino acids. In: S.P.Colowick und N. O. Kaplan (ed.), *Methods in enzymology III*, 554–570. Academic Press Inc., Publishers, New York.
- Hayes F.N., Betty S.Rogers und W.H.Langham. 1956. Counting suspensions in liquid scintillators. *Nucleonics* **14** (Nr. 3), 48–51.
- Heinz E. 1961. Aktiver Transport von Aminosäuren. In: *Biochemie des aktiven Transports*, 167–188. 12. Kolloquium der Gesellschaft für Physiologische Chemie. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Helf S., C.G.White und R.N.Shelley. 1960. Radio-assay of finely divided solids by suspension in a gel scintillator. *Analyt. Chem.* **32**, 238–241.
- Hermans P.H. 1946. Contribution to the physics of cellulose fibers. Elsevier Publishing Company, Inc., Amsterdam.
- Hope A.B. und P.G.Stevens. 1952. Electric potential differences in bean roots and their relation to salt uptake. *Aust. J. Sci. Res.* **B 5**, 335–343.
- Joy K.W. 1962. Transport of organic nitrogen through the phloem in sugar beet. *Nature* **195**, 618–619.
- Levintow L., V.E.Price und J.P.Greenstein. 1950. A resolution of histidin, cystine, and alanine by asymmetric enzymatic hydrolysis of the racemic amides. *J.Biol. Chem.* **184**, 55–62.
- und J.P.Greenstein. 1951. Preparation of D-ornithine, D-citrulline, and D-arginine. *J. Biol. Chem.* **188**, 643–646.
- Levitt J. 1957. The significance of "Apparent Free Space" (AFS) in ion absorption. *Physiol. Plant.* **10**, 882–888.
- Lüttge U. und J.Weigl. 1965. Zur Mikroautoradiographie wasserlöslicher Substanzen. *Planta* **64**, 28–36.
- Magasanik B. 1957. Nutrition of bacteria and fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* **11**, 221–252.
- Maurer W. und E.Primbsch. 1964. Grösse der β -Selbstabsorption bei der H^3 -Autoradiographie. *Exp. Cell Res.* **33**, 8–18.
- Miller O.L., J.R.Stone und D.M.Prescott. 1964. Autoradiography of water-soluble materials. In: D.M.Prescott (ed.), *Methods in cell physiology I*, 371–401. Academic Press, New York und London.
- Mothes K. 1960. Über das Altern der Blätter und die Möglichkeit ihrer Wiederverjüngung. *Naturwiss.* **47**, 337–351.
- Notovny H.M. und R.G.Owens. 1960. Localization of amino-acids for histochemical estimation. *Nature* **186**, 1057–1058.
- Oxender D.L. und H.N.Christensen. 1963. Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by Ehrlich cell. *J. Biol. Chem.* **238**, 3686–3699.
- Perry R.P. 1964. Quantitative autoradiography. In: D.M.Prescott (ed.), *Methods in cell physiology I*, 305–326. Academic Press, New York und London.
- Prescott D.M. 1964. Autoradiography with liquid emulsion. In: D.M.Prescott (ed.), *Methods in cell physiology I*, 365–370. Academic Press, New York und London.
- Price V.E., J.B.Gilbert und J.P.Greenstein. 1949. The resolution of several racemic amino acids. *J. Biol. Chem.* **179**, 1169–1174.

- Ratner E.I., A.M.Smirnov, Huan Hun-chou, S.F.Ukhina und I.N.Kuzovkina. 1963. Assimilation of amino acids as a nitrogen source by isolated alfalfa roots and whole pea plants in sterile cultures. *Fiziol. Rast.* **10**, 673-681.
- Robertson R.N. 1951. Mechanism of absorption and transport of inorganic nutrients in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **2**, 1-24.
- Robertson J.S., V.B.Bond und E.P.Cronite. 1959. Resolution and image spread in autoradiographs of tritium-labeled cells. *Intern. J. Appl. Rad. Isotopes* **7**, 33-37.
- Stumpf P.K. 1951. Transaminases in higher plants. *Fed. Proc.* **10**, 256.
- Wiebe H.H. und P.J.Kramer. 1954. Translocation of radioactive isotopes from various regions of roots of barley seedlings. *Plant Physiol.* **29**, 342-348.
- Winter A.G. und Lisel Willeke. 1951. Untersuchungen über Antibiotica aus höheren Pflanzen und ihre Bedeutung für die Bodenmikrobiologie und Pflanzensoziologie. *Naturwiss.* **38**, 262-264.
- Helge Preuss und F.Schönbeck. 1959a. Untersuchungen über die Aufnahme organischer Substanzen durch die Wurzeln höherer Pflanzen. I. Phenolische Verbindungen. *Naturwiss.* **46**, 536-537.
 - und F.Schönbeck. 1959b. Untersuchungen über die Aufnahme organischer Substanzen durch die Wurzel höherer Pflanzen. II. Phenol. *Naturwiss.* **46**, 537.
 - und Lisel Rings-Willeke. 1959c. Untersuchungen über die Aufnahme organischer Substanzen durch die Wurzel höherer Pflanzen. III. Alkaloide. *Naturwiss.* **46**, 656 bis 657.

Tafel 1

Abbildung 1

Einfluss von L-Leucin auf das Wachstum von *Zea mays* (A-E siehe Tab. 1)

Tafel 2

Abbildung 2

Erhaltung von jungem Wurzelgewebe nach Gefriertrocknung und Autoradiographie.
175mal

Abbildung 3

Erhaltung von älterem Wurzelgewebe nach Gefriertrocknung und Autoradiographie.
175mal

Abbildung 4

Autoradiographie eines Wurzelquerschnittes 1 cm vom Apex entfernt. Die Wurzel wurde während 5 h mit L-Leucin- H^3 gefüttert. 330mal. Erklärungen siehe Text

Abbildung 5

Autoradiographie von Holundermark, das mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 infiltriert wurde.
175mal. Erklärungen siehe Text

Abbildung 6

Holundermarkgewebe, vor der Gefriertrocknung mit 0,5 % Toluidinblau infiltriert. 300mal.
Erklärungen siehe Text

Abbildung 7

Autoradiographie eines Wurzelquerschnitts nach Methode Miller et al. Die Wurzel wurde während 60 min mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 gefüttert. 65mal. Erklärungen siehe Text

Abbildung 8

Ausschnitt aus einem autoradiographierten Wurzelquerschnitt. Jüngere Zone. Die Wurzel wurde während 5 min mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 , 1,25 mc/ml, spez. Aktivität 1,28 c/mM, gefüttert. Der Aktivitätsgradient von der Epidermis zum Zentralzylinder ist erkennbar. Zytoplasma und Zellkerne (Pfeile) sind bereits aktiv. 100mal

Abbildung 9

Ausschnitt aus einem autoradiographierten Wurzelquerschnitt. Ältere Zone. Gleicher Versuch wie in Abbildung 8. Der Aktivitätsgradient von der Epidermis zum Zentralzylinder ist ebenfalls erkennbar. Zellwand- und Zytoplasmaaktivität sind nicht sicher unterscheidbar.
175mal

Tafel 3

Abbildung 10

Autoradiographie von Wurzelhaaren mit Epidermis und Rindenzellen nach 105 min Fütterung mit L-Leucin- H^3 . 400mal

Abbildung 11

Autoradiographie eines Wurzelquerschnitts im Übergang zum Zentralzylinder in ungefähr 5–10 mm Distanz von der Wurzelspitze. Die Wurzel wurde während 300 min mit L-Leucin- H^3 gefüttert. 200mal

Abbildung 12

Autoradiographie eines ausgewaschenen Wurzelquerschnitts ungefähr 5 mm von der Wurzelspitze entfernt. Die apikalen ersten 6 mm der Wurzel wurden während 160 min mit L-Histidin- C^{14} gefüttert. 120mal

Abbildung 13

Autoradiographie eines ausgewaschenen Längsschnitts durch eine Wurzelspitze. Fütterung der Wurzel mit L-Leucin- H^3 150 min. Das Ruhezentrum der Proteinsynthese über den Initialen ist deutlich erkennbar. 85mal

Abbildung 14

Autoradiographie eines ausgewaschenen Wurzelquerschnitts nahe der Wurzelspitze. Fütterung der Wurzel mit D-Leucin- C^{14} während 120 min. 300mal

Abbildung 15

Autoradiographie eines ausgewaschenen Wurzelquerschnitts mit Seitenwurzelanlage. Die mütterliche Wurzelspitze in 100 mm Entfernung wurde während 12 h über die ersten 10 mm mit L-Leucin- H^3 gefüttert. 125mal

Abbildung 16

Autoradiographie eines ausgewaschenen Wurzelquerschnitts mit Seitenwurzelanlage. Die Wurzel wurde während 120 min mit D-Leucin- C^{14} gefüttert. 185mal

Abbildung 17

Autoradiographie eines Wurzelquerschnitts mit Seitenwurzelanlage. Die mütterliche Wurzel wurde während 60 min mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 gefüttert. 155mal

Tafel 4

Abbildung 18

Autoradiographie eines Epicotylquerschnitts. Übersichtsbild mit einem Teil des Zentralzylinders, ganz rechts aussen noch einige Rindenzellen. Fütterung der Wurzel während 60 min mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 . 350mal

Abbildung 19

Ausschnitt von Abbildung 18. Das Xylem ist stark aktiv. 870mal

Abbildung 20

Autoradiographie eines Coleoptilenquerschnitts. Fütterung der Wurzel während 60 min mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 . Aktivität vor allem im Phloem. 65mal

Abbildung 21

Autoradiographie eines Leitbündels der Coleoptile. Fütterung der Wurzel während 60 min mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 . Aktivität vorwiegend im Phloem, im Xylem eine Tracheide ebenfalls stark aktiv. 380mal

Abbildung 22

Autoradiographie junger Blätter im Querschnitt. Fütterung der Wurzel während 60 min mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 . 45mal

Abbildung 23

Autoradiographie eines jungen Blattes mit Leitbündel. Rechts aussen sind noch Zellen der Coleoptile erkennbar. Fütterung der Wurzel während 60 min mit 2-Aminoisobuttersäure- H^3 . Übersichtsbild, Phasenkontrast. 350mal

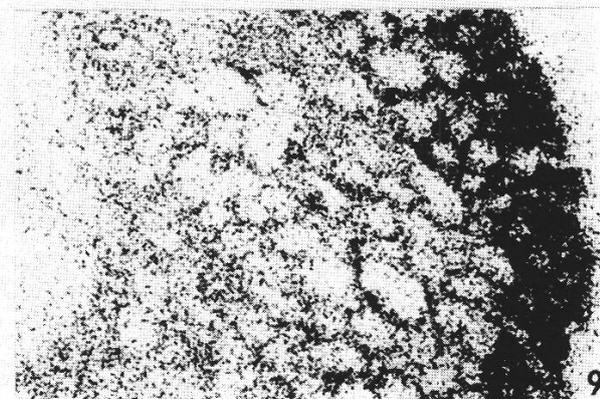
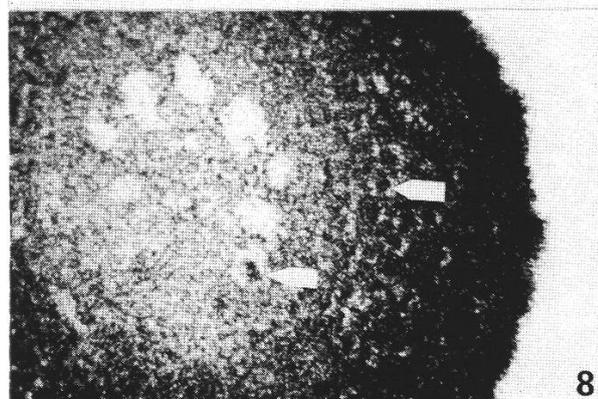
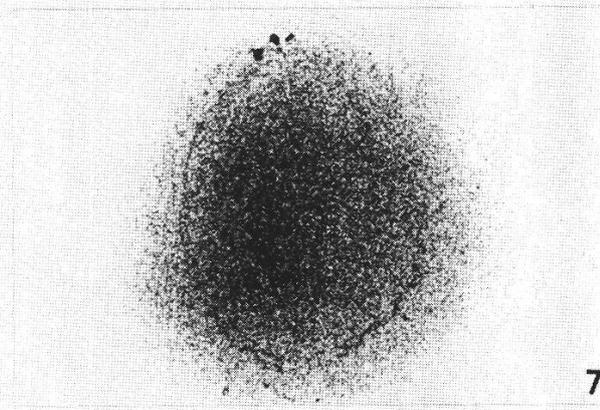
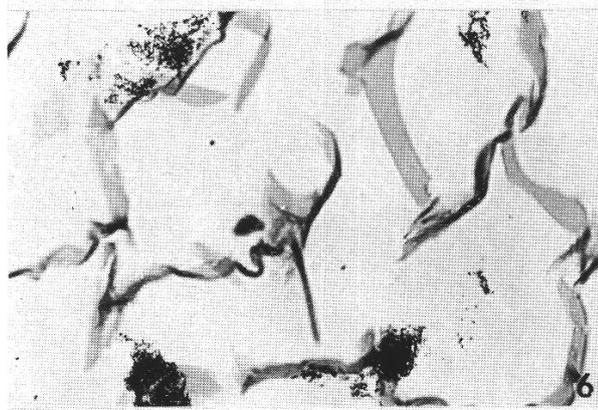
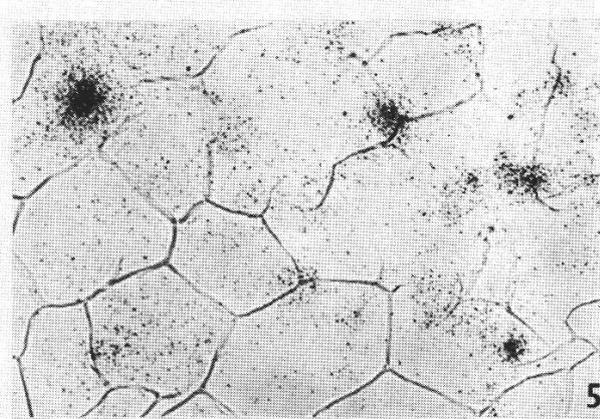
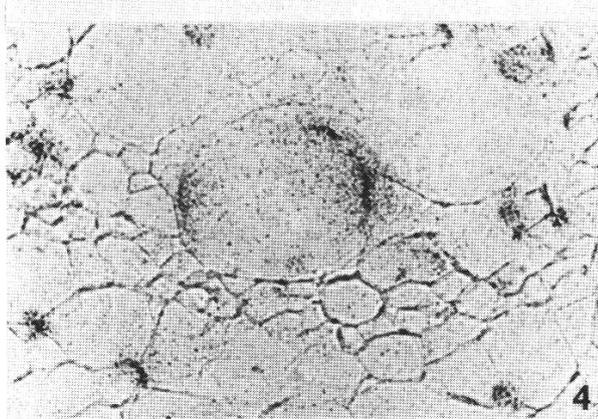
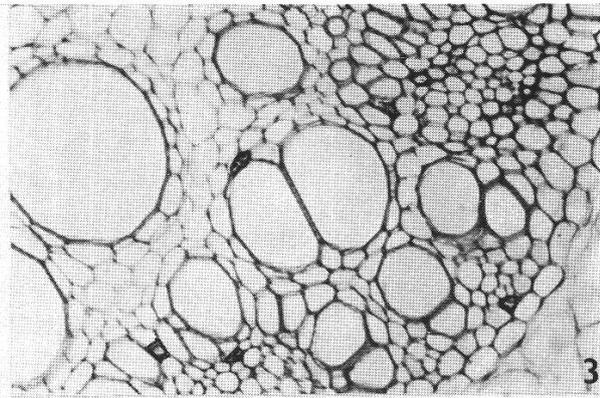
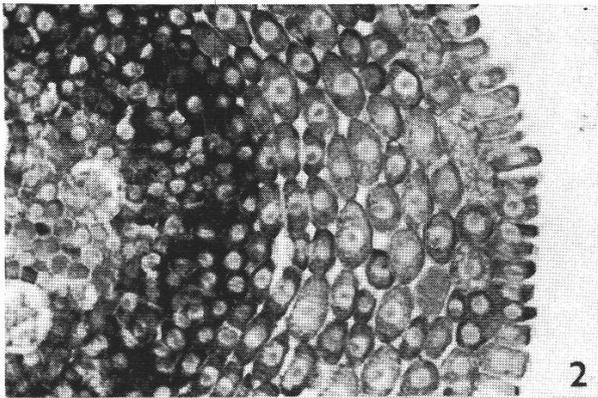
Abbildung 24

Ausschnitt mit Blattleitbündel von Abbildung 23. Das Phloem ist deutlich markiert. 870mal

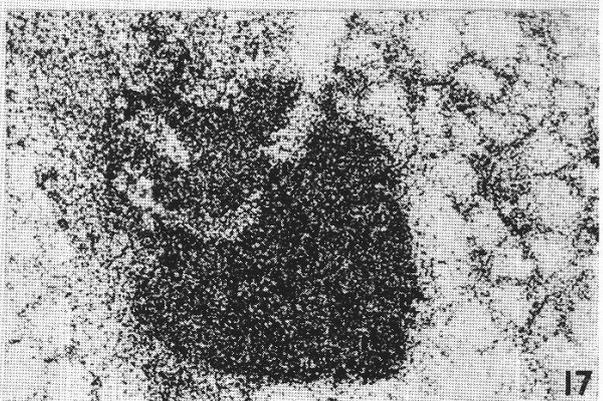
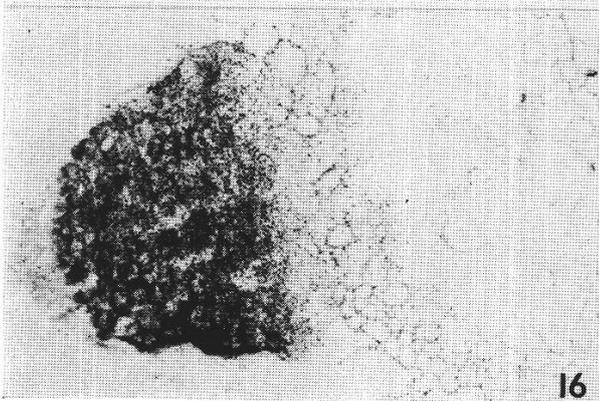
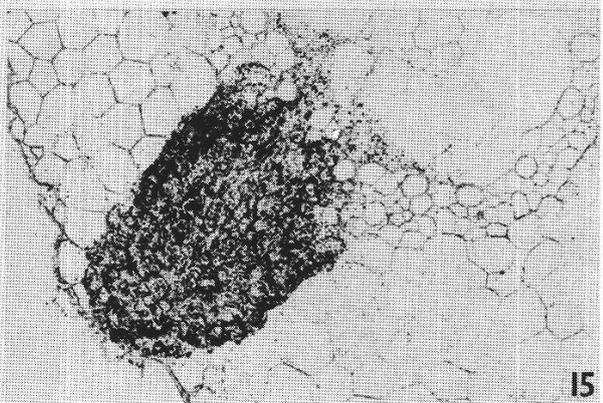
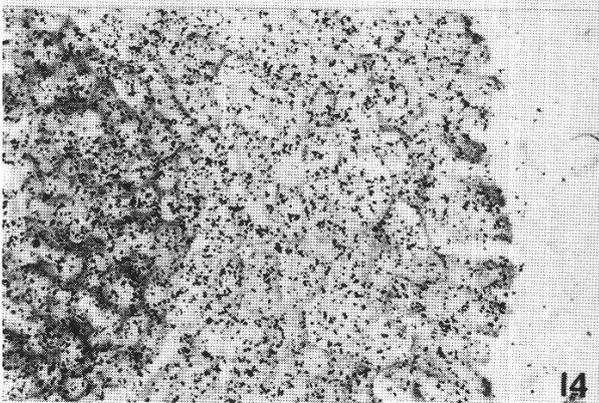
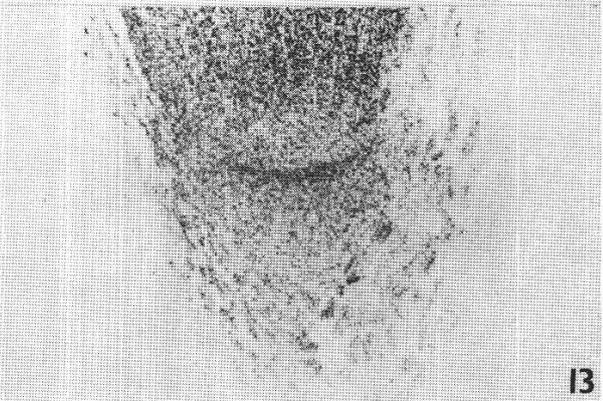
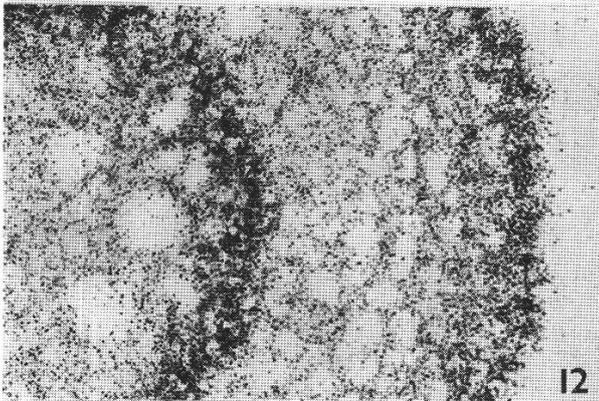
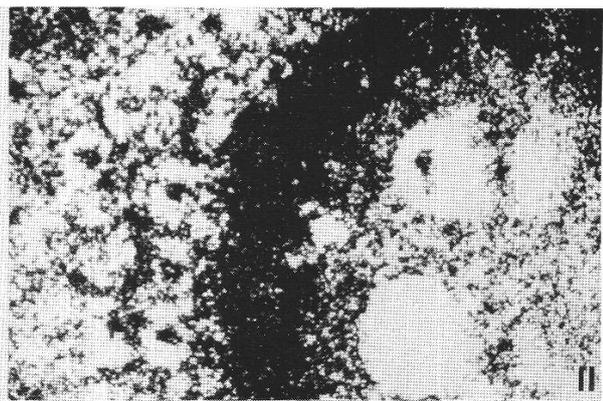
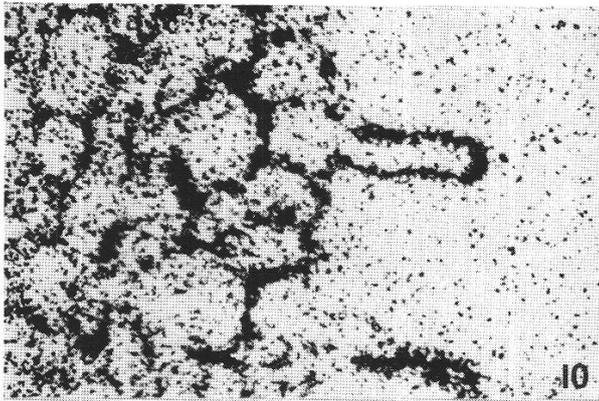
Tafel 1



Tafel 2



Tafel 3



Tafel 4

