

Transportuntersuchungen an *Zea mays* mit Hilfe von THO und Mikroautoradiographie

Autor(en): **Neeracher, Hans**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **75 (1965)**

PDF erstellt am: **26.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-52762>

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.

Transportuntersuchungen an *Zea mays* mit Hilfe von THO und Mikroautoradiographie

Von *Hans Neeracher*

Manuskript eingegangen am 23. Dezember 1965

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	304
II. Methodik	306
1. Pflanzenmaterial	306
2. Fütterung	307
a) Fütterungsklima	307
b) Fütterungsarten mit THO	307
c) Fütterung mit $C^{14}O_2$	307
3. Entwässerung und Fixierung	308
a) Gewöhnliche Methode mit FAA	308
b) Gefriersubstitution	309
c) Gefriertrocknung	309
4. Mikroautoradiographie	309
a) Mikroautoradiographie wasserunlöslicher Substanzen	310
b) Mikroautoradiographie wasserlöslicher Substanzen	310
III. Ergebnisse	310
1. Methodik	310
a) Vergleich der trockenen und nassen Mikroautoradiographie	310
b) Aktivitätsausbeute bei der trockenen und nassen Mikroautoradiographie	313
c) Auflösungsvermögen der beiden Methoden	313
d) Artefakte	314
e) Einfluss der Gewebepreparation	315
f) Wirksamkeit der verschiedenen Blattfütterungsmethoden	315
2. Transportuntersuchungen an <i>Zea mays</i>	316
a) Versuchsprogramm und Auswertung	316
b) Aktivitätsverteilung in der Fütterungszone	318
c) Abwärtstransport in der Lamina des Fütterungsblattes	320
d) Abwärtstransport in der Blattscheide des Fütterungsblattes	321
e) Eintransport der Aktivität in andere Blätter	322
f) Aufwärtstransport in der Blattscheide	323
g) Blattfütterung im Dunkeln	327
h) Wurzelfütterung im Dunkeln	328
3. Transportuntersuchungen an <i>Coffea arabica</i> und <i>Phaseolus vulgaris</i>	329
a) Fütterungszone	329
b) Übriges Blatt	330
IV. Diskussion	331
1. Mikroautoradiographie und Transportuntersuchungen	331

2. Vor- und Nachteile von THO als Tracer für Transportuntersuchungen	331
a) Geschwindigkeit des Wasseraustausches	332
b) Tritiumeinbau in organische Verbindungen bei Verwendung von THO als Tracer der Photosynthese	332
c) Wasserabtransport aus dem Blatt	334
3. Ort der Wasseraufnahme ins Blatt	335
4. Lokalisation des Assimilattransportes	336
5. Die Rolle der Geleitzellen	338
6. Richtung des Transportes	339
7. Aufwärts- und Abwärtstransport in der Blattscheide	339
8. Transportgeschwindigkeit	340
V. Zusammenfassung	340
Literaturverzeichnis	343

Verzeichnis der Abkürzungen

T	Tritium
THO	tritiiertes Wasser
FAA	Fixierungsmittel, aus Formaldehyd, Alkohol und Eisessig zusammengesetzt.

I. Einleitung

Heute kann kaum mehr bezweifelt werden, dass der normale Stofftransport aus Blättern im Phloem vor sich geht (Esau, 1957; Zimmermann, 1960; Crafts, 1961). Nur unter extremen Bedingungen erfolgt er auch zusätzlich im Xylem: Palmquist (1938) fütterte Bohnenpflanzen mit Fluoreszein, indem er die vordere Hälfte eines endständigen Blättchens in die Farblösung tauchte. Bei Pflanzen mit Wasserdefizit konnte er Abtransport im Xylem beobachten. Colwell (1942) fütterte Blätter von Kürbispflanzen mit P^{32} . Wurde der Tracer durch Vakuum-infiltration appliziert oder auf eine grosse Blattfläche aufgetragen, trat deutlich zusätzlicher Abtransport im Xylem auf. Perkins (1959) fand ebenfalls Xylemtransport, wenn er markierte Zucker über Blattstiele (Lamina abgeschnitten) in die Versuchspflanze einführte. Clor (1962) studierte den Stofftransport aus Kotyledonen von Baumwollsetzlingen. Wurden die Pflanzen während des Versuchs bei 100 % Luftfeuchtigkeit gehalten, behinderte eine Ringelung des Blattstieles den Abtransport von Assimilaten und 2,4-D nicht mehr.

Das Phloem setzt sich meist aus drei Gewebearten zusammen: dem Phloemparenchym, den Siebzellen und den dazugehörigen Geleitzellen. Anatomische und physiologische Gründe lassen die hochspezialisierten

Siebzellen als Transportbahnen besonders geeignet erscheinen (Esau, 1957). Schumacher (1930) konnte zeigen, dass das Phloemparenchym als Transportweg keine Rolle spielt: Er beobachtete, dass blattgefüttertes Eosin bei vielen Pflanzen im Phloem des Blattstieles Sieb- und Geleitzellen tötet, während das Phloemparenchym unversehrt bleibt. Solche Blätter zeigten bei Verdunkelung im Gegensatz zu unbehandelten Blättern keinen Stickstoffabtransport mehr. Schwieriger ist die Frage zu beantworten, ob die Geleitzellen am Transport direkt beteiligt sind oder nicht. Bei Versuchen mit Fluorochromen leuchteten nebst den Siebzellen auch die Geleitzellen auf (Schumacher, 1932 und 1937; Bauer, 1949 und 1953; Eschrich, 1953). Mikroautoradiographische Transportuntersuchungen führten bisher zu keinen eindeutigen Ergebnissen: Perkins (1959) stellte fest, dass die Auflösung mit C^{14} es nicht zu entscheiden gestatte, ob die Assimilate zuerst in den Siebzellen oder den Geleitzellen auftreten. In Schnitten mit relativ tiefem Aktivitätsniveau beobachtete er vereinzelte Geleitzellen, die stärker markiert waren als die zugehörigen Siebzellen. Die betreffenden Präparate waren jedoch laut Perkins ungeeignet zum Photographieren. Gage (1960) verwendete Tritium als Tracer. Er hatte mit grossen technischen Schwierigkeiten zu kämpfen (Verlust und Verschiebung von Schnitten, Diffusion von Aktivität, schlechte Schneidbarkeit der Objekte) und bezeichnete die erhaltenen Resultate als «im allgemeinen enttäuschend». In den brauchbaren Autoradiographien war die Aktivität mit dem Phloem verbunden. In einem einzelnen Querschnittpräparat zeigten die Geleitzellen stärkere Schwärzung als die Siebzellen. Leider kann die publizierte Photographie keinen rechten Eindruck davon vermitteln.

Umstritten ist die Frage, wo der Transport innerhalb der Siebröhren vor sich geht. Untersuchungen in dieser Richtung waren bisher nur mit Fluorochromen möglich. Schumacher (1932) fand eine deutliche Farbstoffwanderung im Plasma der Siebröhren. Ihm wurde jedoch von Rouschal (1941) und Bauer (1949) widersprochen, welche auch den Vakuolensaft aufleuchten sahen.

Über den Mechanismus des Assimilattransportes gibt es eine ganze Reihe von Theorien. Sie unterscheiden sich in ihren Annahmen vor allem in bezug auf Wesen und Einsatzort der Energie, Natur des Steuerungsvorganges und Art des Transportmediums. In diesem Punkt stehen hauptsächlich drei Vorstellungen im Vordergrund: Die Stoffe können in einem wässrigen Strom durch die Vakuole der Siebröhren fliessen (= Massenstrom), im ruhenden Plasma wandern («aktive» Diffusion) oder im strömenden Plasma transportiert werden. Die Möglichkeit eines Plasma-transportes rückt neuerdings vermehrt in den Vordergrund, seit Thaine (1961) in den Siebzellen von *Primula obconica* Plasmastränge entdeckte, welche die Vakuolen durchziehen und durch die Siebplatten nicht unter-

brochen werden (= Transcellular Strands). Partikel von Mitochondrien-grösse wurden in diesen Strängen über viele Siebröhrenelemente hinweg mit einer Geschwindigkeit von 3–5 cm/h transportiert. In andern Strängen der selben Siebröhre strömten Partikel in entgegengesetzter Richtung.

Es wäre eines der stärksten Argumente gegen einen Massenstrom, wenn sich in der selben Siebzelle gleichzeitiger Transport in entgegengesetzter Richtung beweisen liesse. Für die Rinde als Ganzes liegen einige Experimente vor, die für einen solchen Sachverhalt sprechen (Mason, 1936; Palmquist, 1938; Chen, 1951). Biddulph (1960) konnte makroautoradiographisch zeigen, dass in jüngeren Phloemsträngen gleichzeitiger Transport in entgegengesetzter Richtung stattfindet (C^{14} -Assimilate, P^{32}), während im ältern Phloem meist getrennte Stränge dazu benützt werden. All diesen Versuchen kann jedoch entgegengehalten werden, dass es sich wohl um gleichzeitigen Transport in entgegengesetzter Richtung im gleichen Leitgewebe, nicht aber in der gleichen Zelle handelt (Rouschal, 1941; Esau, 1957).

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, über die Rolle der Geleitzellen im Assimilattransport mit Hilfe der Mikroautoradiographie Hinweise zu erhalten. Da mit C^{14} keine genügende Auflösung erreicht werden kann (Perkins, 1959), wurde den Blättern als Substrat für die Photosynthese Tritiumwasser angeboten. Als Versuchspflanze wurde Mais gewählt, weil das Phloem seiner Leitbündel eine besonders regelmässige Gliederung in deutlich unterscheidbare Geleit- und Siebzellen aufweist. Ferner war beabsichtigt, den Assimilataustausch zwischen alten und jungen Blättern sowie den lateralen Transport im Fütterungsblatt zu untersuchen. Junger Mais hat den Vorteil, auf engstem Raum wachsende und ausgewachsene Blätter zu besitzen, während die Kleinheit der Pflanze ein praktisch lückenloses Verfolgen der Aktivität noch gestattet. Die drei ältesten Blätter wurden abwechslungsweise gefüttert, so dass für jedes dieser Blätter sowohl die Kanäle des Eintransportes wie des Abtransportes untersucht werden konnten. Nebst Mais wurden ergänzende Versuche mit *Coffea arabica* und *Phaseolus vulgaris* angestellt.

II. Methodik

1. Pflanzenmaterial

Alle Pflanzen wuchsen im Treibhaus auf. Die Samen von *Zea mays* und *Phaseolus vulgaris* wurden 12 h gequollen, vier Tage in Sägemehl gekeimt und anschliessend in 1:1 verdünnter, gut durchlüfteter Hoaglandlösung aufgezogen. *Phaseolus* hatte bei Versuchsbeginn zwei voll entwickelte trifoliolate Blätter (etwa dreissig Tage alt), *Zea mays* nebst der Koleoptile zwei ausgewachsene Laubblätter (etwa vierzehn Tage alt).

Coffea arabica, Sorte Bourbon, wurde in Erde kultiviert. Die Versuchspflanzen waren ein bis eineinhalb Jahre alt und wiesen neun bis elf Blattpaare auf.

2. Fütterung

a) Fütterungsklima

Die Pflanzen wurden 2 h vor Versuchsbeginn zur Akklimatisation in die Fütterungskammer (mit Kunststoffolie überzogener Holzrahmen, $55 \times 60 \times 65$ cm) gestellt und die Nährlösung weiterhin belüftet. Die Lufttemperatur betrug $22-24^\circ$. Lufterneuerung und Feuchtigkeitseinstellung erfolgten mit Hilfe einer Aquariumpumpe, welche Luft durch Wasser hindurch in die Kammer hineinpresste. Die Abluft wurde durch einen Schlauch ins Freie geleitet. Die auf diese Weise erzeugten Luftfeuchtigkeitswerte lagen bei $70 \pm 5\%$. Bei trübem Wetter wurde zusätzlich mit einer Philips-Quecksilberdampflampe HPL, 400 W, beleuchtet (Abstand von der Versuchspflanze 100 cm).

b) Fütterungsarten mit THO

Als Fütterungsgefäß diente ein Glasröhrchen mit 5 mm Innendurchmesser. Die spezifische Aktivität des THO betrug 20 mC/ml. Der Tracer wurde auf drei verschiedene Weisen appliziert:

Blattlappenfütterung: Mit einer Rasierklinge wurde spitzwärts eine rechteckige Blattzunge (4×15 mm) mit median gelegener Basis herausgeschnitten und ins Fütterungsgefäß eingeführt.

Blattspitzenfütterung: Die unversehrte Blattspitze wurde eingetaucht.

Wurzelfütterung: Als Fütterungsgefäß wurde ein weithalsiges 20-ml-Glasfläschchen verwendet, das mit 8 ml Nährlösung gefüllt war. Das Wurzelwerk der Maispflänzchen wurde sorgfältig eingeführt, bei Fütterungsbeginn 2 ml THO der spez. Aktivität 100 mC/ml zugegeben und das Gefäß mit einem Wattepfropf abgedichtet. Alle Wurzelfütterungsversuche erfolgten im Dunkeln.

c) Fütterung mit $C^{14}O_2$

Von einer gut belichteten Bohnenpflanze wurde das endständige Blatt des ersten trifoliaten Blattes in eine runde, flache Plexiglasküvette eingeschlossen und aus Ba $C^{14}O_3$ mittels Milchsäure 50 mC $C^{14}O_2$ entwickelt. Nach 30 min Fütterung wurde das restliche $C^{14}O_2$ mit Kalilauge ausgefällt, die Küvette entfernt und die Pflanze vor der Ernte 3 h dunkel gestellt.

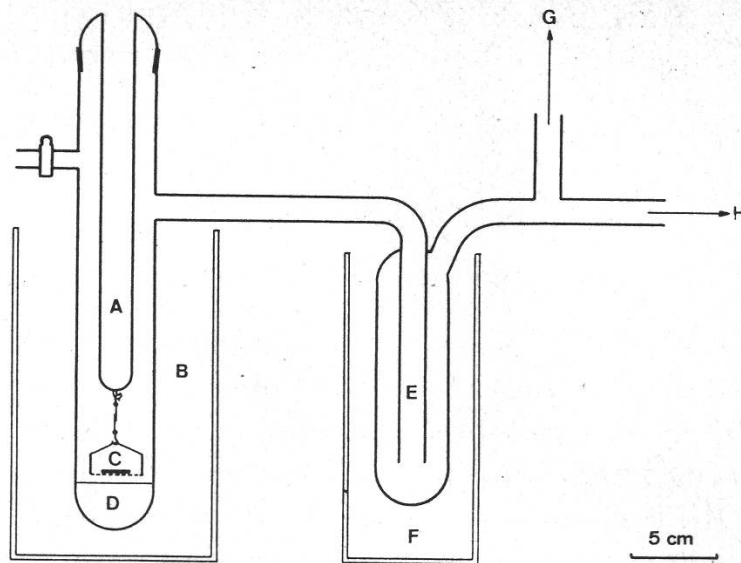


Abbildung 1

Gefriertrocknungsanlage. A = Kühlfinger. B = Kältegefäß mit variabler Temperatur. C = Kupfersieb mit Trocknungsgut. D = entgastetes Esterwachs. E = Kühlfalle. F = Dewargefäß mit Aceton-Trockeneis-Gemisch. G = Vakuummessgerät. H = Vakuumpumpe

3. Entwässerung und Fixierung

Die hauptsächlichsten Transportsubstanzen der Pflanze sind gut wasserlöslich, ebenso die primären Produkte der Photosynthese. FAA-Fixierung führt zu einem Verlust dieser Verbindungen. Für eine Gewebepreparation ohne Herauswaschung wasserlöslicher Substanzen stehen zwei Methoden zur Verfügung: die Gefriertrocknung und die Gefriersubstitution. Bei beiden Verfahren werden die zu entwässernden Gewebeproben unmittelbar nach der Ernte in kaltes Isopentan (-170°) oder n-Pentan (-120°) getaucht. Dieses rasche Einfrieren stoppt augenblicklich alle weiteren Stoffverschiebungen und verhindert zugleich die gewebezerstörende Eiskristallbildung. Gefriertrocknung und Gefriersubstitution sind in erster Linie Entwässerungsmethoden. Eine leichte Fixierung erfolgt erst beim Einbetten. Theorie und Praxis beider Verfahren sind bei Jensen (1962) ausführlich beschrieben.

Die Gefriersubstitution ist wesentlich einfacher zu handhaben. Hancox (1957) zeigte, dass die wasserlöslichen Substanzen auch bei dieser Methode erhalten bleiben. Zur Sicherheit prüfte ich seine Ergebnisse nach.

a) Gewöhnliche Fixierung und Entwässerung mit FAA

Diese Methode wurde für Gewebeproben angewandt, deren wasserlösliche Stoffe vorgängig durch 3 h Extraktion in 80 % Alkohol herausgelöst worden waren. Nach der Fixierung (Fixierlösung: 50 ml 96 % Alkohol, 5 ml Eisessig, 10 ml 40 % Formaldehyd, 35 ml H_2O) wurden die Gewebe in

96% Alkohol entwässert, über 70% Alkohol und Cellosolve in Esterwachs übergeführt und nach 48 h eingebettet.

b) Gefriersubstitution

Die Gewebe wurden dreimal 24 h in abs. Alkohol bei -70° entwässert, im letzten Alkoholbad auf Zimmertemperatur aufgetaut (2 h), in ein 1:1-Gemisch abs. Alkohol/Esterwachs übergeführt und über Nacht im Wärmeschrank (50°) stehen gelassen. In dieser Phase findet Fixierung statt. Nach 24 h in reinem Esterwachs folgte die Einbettung.

c) Gefriertrocknung

Die Apparatur wurde nach den Prinzipien von Glick (1952) aufgebaut, jedoch statt einer Öldiffusionspumpe eine Drehschieberpumpe mit Endvakuum 10^{-2} mm verwendet (Abb. 1). Vorversuche hatten ergeben, dass diese Methode für Maisgewebe brauchbare Ergebnisse liefert. Die Trocknung begann bei -45° . Alle 12 h wurde die Temperatur um 3° erhöht, bis zu einer Endtemperatur von -33° . Beide Kühlfinger wurden mit Aceton-Trockeneis gekühlt. Die Verlängerung der Trocknungszeit von drei auf fünf Tage hatte keinen Einfluss auf die Qualität der Einbettung. Das Rohr mit dem Trocknungsgut wurde aufgetaut, ohne das Vakuum zu unterbrechen, und anschliessend in ein Wasserbad getaucht (50°), um das entgaste Esterwachs am Boden zu schmelzen. Zugleich schmolz die Verbindung eines mit Esterwachs zusammengeklebten Fadens, mit dem das Kupfersieb mit den Geweben am Kühlfinger aufgehängt worden war. Nach 30 min Infiltration im Vakuum wurde die Pumpe abgestellt, das Trocknungsgut in frisches Esterwachs übergeführt und nach weiteren 24 h eingebettet.

4. Mikroautoradiographie

Die Mikroautoradiographie wasserunlöslicher Substanzen (= nasse Methode), von Pelc (1947) entwickelt, kann heute als Routineverfahren bezeichnet werden. Nicht so die Mikroautoradiographie wasserlöslicher Verbindungen (= trockene Methode). Seit Russell (1949) es mit Fällung der herauswaschbaren Verbindung versuchte, wurden viele andere Wege ausprobiert (Winteringham, 1950; Canny, 1955; Biddulph, 1956; Perkins, 1959; Branton, 1962; Miller, 1964). In dieser Arbeit wurde das Verfahren von Branton (1962) angewandt. Die Theorie der Autoradiographie ist bei Boyd (1955) ausführlich beschrieben.

Ich verwendete Kodak-Stripping-Filme AR-10, $12 \times 16,5$ cm. Für die Arbeit im Dunkelraum wurde die Philips-Rotlichtlampe PF 712 benützt.

a) Mikroautoradiographie wasserunlöslicher Substanzen
(nasse Methode)

Mit Chromschwefelsäure gereinigte Objektträger wurden mit möglichst wenig Eiweissglycerin eingerieben, 10 μ dicke Mikrotomschnitte aufgelegt, leicht angedrückt und über warmer Luft zum Schmelzen gebracht. Das Esterwachs wurde mittels zweier Xylolbäder (je 5 min) und kurzem, wiederholtem Eintauchen in abs. Alkohol entfernt. Die Objektträger konnten über Nacht an der Luft trocknen. Je Platte wurden 10 Filmstücke geschnitten, Emulsion gegen unten auf destilliertem Wasser von 24° gestreckt (2 min) und mit dem Objektträger aufgehoben, so dass sich die Ränder des Filmes auf der Rückseite gut überdeckten. Die in waagrechtlicher Lage luftgetrockneten Filme (24 h) wurden in lichtdichten Präparatenschachteln im Kühlschrank (5°) vier Wochen exponiert, mit Kodak D-19b entwickelt (7 min), zweimal 10 sec gewässert, mit Unifix Nr. 1 fixiert (12 min) und 30 min in fließendem Leitungswasser gewässert. Um Kalkflecken zu vermeiden, folgten drei Bäder mit destilliertem Wasser (je 5 min), bevor die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (35%, 70%, 95%, 98%, 100%) getrocknet und in Euparal eingeschlossen wurden.

b) Mikroautoradiographie wasserlöslicher Substanzen
(trockene Methode) nach Branton (1962)

Die Stripping-Filme wurden auf chromschwefelsäuregereinigte Objektträger aufgezogen, Emulsion gegen oben, und 48 h luftgetrocknet. Teflonblätter wurden auf eine weiche Unterlage gelegt, 5 μ und 10 μ dicke Schnitte darauf angeordnet, die Objektträger mit den Filmen vorsichtig aufgelegt und senkrecht leicht angedrückt. Vor dem Entfernen des Esterwachses (zweimal 5 min Xylol) müssen die Schnitte auf dem Film befestigt werden, was durch Eintauchen in eine Cellulose-Acetat-Lösung (20 sec) geschieht. Die weiteren Präparationen sind dieselben wie bei der nassen Methode.

Es wurde vier Wochen im Vakuum (1 mm Hg) über Silikagel exponiert, um Diffusion radioaktiver wasserlöslicher Substanzen vom Schnitt in den Film hinein zu vermeiden.

III. Ergebnisse

1. Methodik

a) Vergleich der trockenen und nassen Mikroautoradiographie

Es wurde eine Reihe von Versuchen unternommen, um Aktivitätsausbeute, Erhaltung wasserlöslicher radioaktiver Substanzen und Auflösungsvermögen vergleichen zu können.

Tabelle 1

Gewebepräparation	Nasse Methode		Trockene Methode Esterwachs			
			vor Exposition entfernt		nach Exposition entfernt	
	T	C ¹⁴	T	C ¹⁴	T	C ¹⁴
Gefriersubstitution	○	+	++	++	○○	+(+)
Gefriersubstitution, aufgezogene Schnitte 30 min bis 3 h in 80 % Alkohol oder H ₂ O extrahiert	○	○	—	—	—	—
Extraktion 3 h in 80 % Alkohol, FAA-Fixierung	○	—	+	—	○○	—

++ = maximal erreichte Aktivitätsausbeute

+ = wenig wasserlösliche Aktivität mehr vorhanden

○○ = Ausbeuteschwankungen und generelle Herabsetzung der Ausbeute

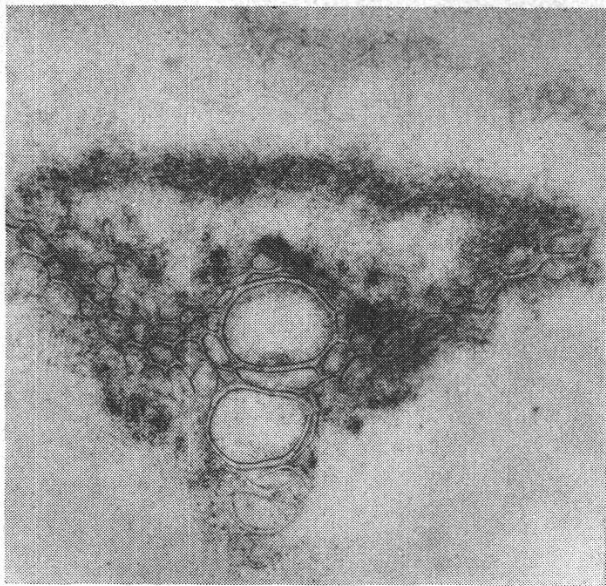
○ = keine wasserlösliche Aktivität mehr vorhanden (auf 3 h Extraktion der Schnitte bezogen)

— = keine Versuche vorliegend

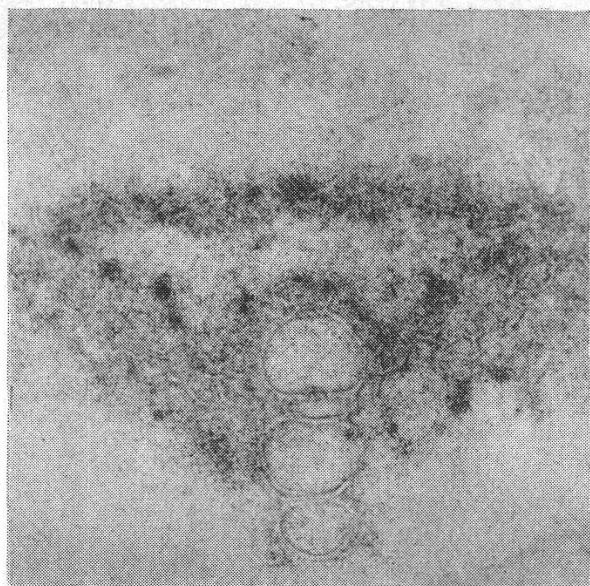
Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass beim nassen Stripping-Film-Verfahren durch das kurze Eintauchen in Wasser beim Aufziehen des Filmes sämtliche der Abbildung zugängliche wasserlösliche Tritiumaktivität gewaschen wird. Die wasserlösliche C¹⁴-Aktivität bleibt wenigstens teilweise erhalten (Abb. 2, 3). Offensichtlich werden beim Tritium nur unmittelbar an der Oberfläche des Schnittes befindliche aktive Stoffe abgebildet, während bei C¹⁴ auch in grösseren Schnittiefen liegende Aktivität den Film zu schwärzen vermag (s. auch Winteringham, 1950).

Wurde beim trockenen Verfahren das Esterwachs erst nach der Exposition entfernt, liess sich nur hochkonzentrierte Tritiumaktivität einigermaßen regelmässig abbilden. Vermutlich ist der Kontakt zwischen Film und Schnitt zu schlecht, und es liegt eine zwar dünne, aber Strahlung absorbierende Esterwachsschicht über den Zellen und lässt nur β -Teilchen mit überdurchschnittlicher Energie durchtreten. Für diese Deutung spricht das Ergebnis mit C¹⁴-Aktivität: Wurde das Esterwachs schon vor der Exposition entfernt, war die Aktivitätsausbeute nur wenig höher als beim Entfernen nach der Exposition, hingegen war die Auflösung im ersten Fall wegen des engeren Kontaktes bedeutend besser (Abb. 4, 5).

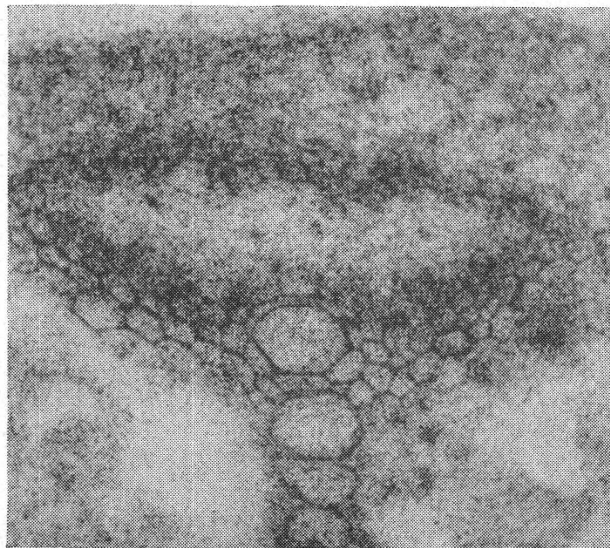
Aufgrund dieser Ergebnisse sah ich mich gezwungen, das Brantonverfahren zu modifizieren und das Esterwachs schon vor der Exposition zu entfernen.



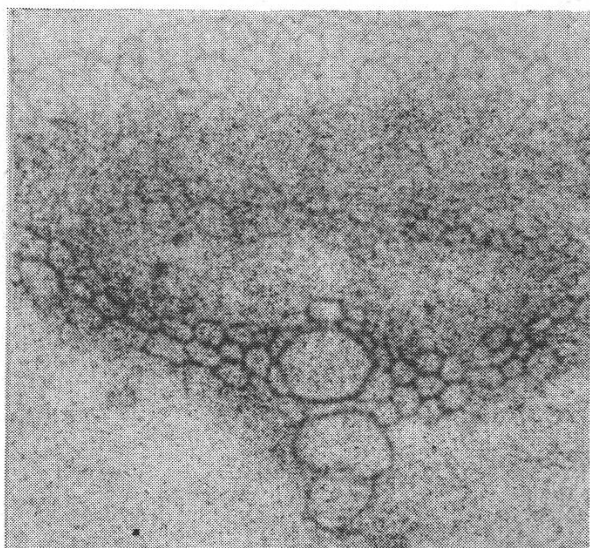
2



3



4



5

Abbildungen 2 bis 5

Phaseolus, 30 min mit $50 \mu\text{C C}^{14}\text{O}_2$ gefüttert. Die Schnitte stammen von der gleichen gefriersubstituierten Gewebeprobe, einem Stück Blattstiel 5 cm vom Fütterungsblatt entfernt, wurden jedoch nach verschiedenen Methoden autoradiographiert

Abbildung 2: Schnitte auf Objektträger aufgezogen, 4 h in 80 % Alkohol extrahiert, nasse Autoradiographie. Sämtliche wasserlösliche Aktivität herausgewaschen

Abbildung 3: Nasse Autoradiographie. Die Aktivität ist vor allem im Phloem etwas höher als bei Abbildung 2

Abbildung 4: Trockene Autoradiographie, Esterwachs vor der Exposition entfernt. Aktivität generell höher. Vor allem auch die Parenchyme weisen mehr Schwärzungen auf

Abbildung 5: Trockene Autoradiographie, Esterwachs nach Exposition entfernt. Die Schwärzungen sind fast so intensiv wie bei Abbildung 4. Die Aktivität ist jedoch viel diffuser verteilt, die Auflösung bedeutend schlechter. Vergrößerung 200mal

b) Aktivitätsausbeute bei der trockenen und der nassen Autoradiographie

Ein Mass für die Ausbeute gibt die Zahl der Zerfallprozesse, die zur Erzeugung eines Bildes notwendig sind. Maurer (1963) errechnet 16 T-Zerfallprozesse/Korn für 3 μ dicke Metacrylatschnitte und AR-10-Filme, Kisielski (1961) benötigt bei 3 μ dicken Paraffinschnitten 200 Zerfälle. Die Höhe der Ausbeute hängt von der Selbstabsorption der aktiven Gewebe, der Distanz von Quelle zu Film und der Silberkorndichte der Emulsion ab.

In dieser Arbeit wurde nur mittels Aktivitätsschätzungen und -vergleichs ausgewertet. Auf eine zahlenmässige Bestimmung der Ausbeute wurde verzichtet. Auch bei dieser Art Auswertung ist es jedoch notwendig, dass die Aktivitätsausbeute regelmässig ist. Für das nasse Stripping-Film-Verfahren ist diese Forderung erfüllt, für das trockene nicht. Zwar ist die Ausbeute im besten Fall so gut wie beim nassen Verfahren, sie kann jedoch zwischen verschiedenen Präparatserien und sogar innerhalb desselben Schnittes beträchtlich schwanken. Unter diesen Umständen sind Aktivitätsvergleiche unmöglich. Wenn es sich um kurzzeitige Versuche handelt (weniger als 2 h Fütterung), sind sogar für qualitative Aussagen (Aktivität ja oder nein) grosse Präparatenserien erforderlich. Erst bei länger dauernden Versuchen (2 h und darüber) äussern sich Ausbeuteschwankungen dank höherer Aktivität nur noch in graduellen Schwärzungsunterschieden.

c) Das Auflösungsvermögen der beiden Methoden

Robertson (1959) erhält für Tritiumquellen mit direktem Emulsionskontakt Auflösungen von 0,2 μ (C^{14} : 2 μ). Für Quellen in grösserer Gewebetiefe (1 μ und darüber) wird die Auflösung immer schlechter, die Ausbeute nimmt ab, die Unschärfe des Bildes zu. Eine 1 μ dicke Celloidinschicht genügt schon, um fast alle β -Strahlung des Tritiums zu absorbieren.

Die Befunde Robertsons decken sich gut mit den eigenen Ergebnissen. Bei der nassen Autoradiographie liessen sich die Schwärzungen noch gut den Zellstrukturen, wie Chlorophyllkörner und Plasmawandbelag, zurechnen. Bei der trockenen Methode war die Auflösung fast durchwegs schlechter. Im besten Fall liessen sich noch einzelne Zellen (z.B. Sieb- und Geleitzellen) auflösen, aber nie über den ganzen Schnitt. Häufig war die Auflösung nicht besser als mit C^{14} . Schwankende Ausbeute und ungleiches Auflösungsvermögen sprechen dafür, dass bei der trockenen Methode der Kontakt zwischen Film und Objekt häufig ungenügend ist.

d) Artefakte

Das autoradiographische Bild entsteht dadurch, dass ein β -Teilchen mit genügender Energie auf eines der strahlungsempfindlichen Silber-salzkristalle der Emulsion auftrifft und ein «latentes» Bild erzeugt. Die latenten Bilder lassen sich zu Schwärzungspunkten entwickeln. Mechanische Beanspruchung des Filmes und reduzierende Reagenzien erzeugen zusätzliche latente Bilder, was sich im Ansteigen des Filmhintergrundes äussert. Enthält jedoch der Schnitt reduzierende Stoffe oder erfolgt die mechanische Beanspruchung über den Schnitt, so entstehen «positive» Artefakte, die Gewebeaktivität vortäuschen können. Oxydationsmittel dagegen bringen latente Bilder zum Verschwinden, erniedrigen den Hintergrund, hindern aber auch vorhandene Aktivität an der Abbildung. Bei Lokalisation des Oxydationsmittels auf die Gewebe entstehen «negative» Artefakte. Enthalten nur einzelne Gewebe des Schnittes oxydierende Stoffe, entstehen falsche Verteilungsbilder.

Artefakte können vor allem durch Blindproben mit inaktiven Geweben identifiziert werden. Handelt es sich um positive Artefakte, so müssen diese auch mit inaktiven Geweben erzeugbar sein (gleiche Gewebepreparation vorausgesetzt!), während negative Artefakte sich durch Schwärzungslöcher bei Filmen mit starkem Hintergrund äussern müssten.

Bei der nassen Autoradiographie treten gelegentlich leicht erkennbare Artefakte auf: Über stark verholzten Zellwänden und äussern Epidermiswänden waren Schwärzungspunkte reihenförmig angeordnet. Sie gaben sich durch ihr unsystematisches Auftreten und ihre immer senkrecht zur stärksten Ausdehnungsrichtung des Filmes angeordnete Lage als Artefakte zu erkennen.

Die trockene Methode war bedeutend artefaktanfälliger. Sogar fabriksfrische Filme ertrugen manchmal den Kontakt mit Xylol und Celluloseacetat-Lösung nicht und antworteten mit bis zu Unbrauchbarkeit erhöhtem Hintergrund. Rund ein Drittel bis die Hälfte aller Platten reagierten auf diese Weise. Dass der Film und nicht die Qualität der Reagenzien darüber entschied, zeigte sich bei gleichzeitiger Verwendung verschiedener Filmpakete.

Druckartefakte, hervorgerufen durch das Anpressen der Schnitte auf die Emulsion, traten nur bei extrem starkem Druck auf.

Hingegen fand ich bei Mais hin und wieder einen Artefakt, dessen Natur ich nicht abzuklären vermochte. Er trat ausschliesslich in Form von Schwärzungen über gut entwickelten Bündeln auf und fehlte über intermediären Bündeln. Häufigkeit des Auftretens und Intensität der Schwärzung erwiesen sich als unabhängig von Anpressdruck und Expositionszeit. Die Schwärzungen waren meist schwach, erfassten nur Teile des

Bündels und zeigten keinen Zusammenhang mit Gewebearten, Zellen oder Zellstrukturen. Innerhalb eines Präparates wurden nie alle Schnitte betroffen, und je Schnitt waren es nur vereinzelte verstreute Bündel. Es wurden darum für die Auswertung nur solche Präparate als genügend erachtet, die systematische, den Zellen und Zellstrukturen zuweisbare Schwärzungen zeigten.

Alles in allem mussten wegen Artefakten oder Artefaktverdachts 70–80% aller trockenen Präparate und 5–10% aller nassen Präparate ausgeschieden werden.

e) Einfluss der Gewebepräparation

Von zwei 5 h gefütterten Maispflanzen wurden je vier Proben entnommen, halbiert und die eine Hälfte gefriergetrocknet, die andere gefrier-substituiert. Die autoradiographische Untersuchung liess, in Übereinstimmung mit Hancox (1957), keinen Unterschied in der Erhaltung wasserlöslicher Aktivität erkennen. Hingegen waren die Gewebestrukturen bei gefriergetrockneten Maisproben nur stellenweise intakt, bei Coffea bis zur Unbrauchbarkeit zerrissen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für alle weiteren Versuche die Gefriersubstitution angewandt.

f) Wirksamkeit der verschiedenen Blattfütterungsmethoden

Es muss zwischen Wasseraufnahme aus und Wasseraustausch mit Umgebungswasser unterschieden werden. Der Motor für eine Wasseraufnahme durch Pflanzenblätter ist die osmotische Saugkraft der Zellen. Die Geschwindigkeit der Aufnahme hängt von der Grösse der Saugkraft und dem kutikulären Widerstand ab (Gessner, 1956). Umweltsfaktoren, welche im Blatt ein Wasserdefizit erzeugen können, begünstigen zugleich den negativen Wassertransport (aus dem Blatt in die Wurzel).

Wie Vaadia (1963) und Vartapetyan (1961) zeigten, findet auch ohne Wasserdefizit im Blatt ein Austausch zwischen Blattwasser und Aussenwasser statt, dessen Geschwindigkeit durch den Kutikularwiderstand begrenzt wird. Das ausgetauschte Wasser wird nur sehr langsam und in geringen Mengen abtransportiert (Vaadia, 1963).

Für Transportuntersuchungen mit THO muss jeder negative Wassertransport vermieden werden (siehe Diskussion!). Das Wasseraustauschverfahren bietet die Möglichkeit an, radioaktives Wasser ins Blatt einzuführen, ohne dass dadurch negativer Wassertransport begünstigt würde.

Um die Kutikulabildung auf ein Minimum zu reduzieren, wurde die Pflanzenaufzucht in Nährlösungen, bei hoher Luftfeuchtigkeit und Schutz vor direkter Sonneneinstrahlung vorgenommen.

Vergleichende Versuche ergaben, dass bei der Blattlappenfütterung je Zeiteinheit mehr Aktivität aufgenommen wurde als bei der Blattspitzenfütterung. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass bei der Blattlappenfütterung die Ränder dem Wasseraustausch keinen Widerstand entgegenzusetzen vermögen.

2. Transportversuche an *Zea mays*

a) Versuchsprogramm und Auswertung

Die Pflanzen wurden nach der Fütterung in der Regel sofort geerntet (Fütterungszeit = Versuchszeit). Eine Zusammenstellung der Versuche gibt Tabelle 2.

Wird bei Assimilattransportuntersuchungen der Pflanze THO als Substrat für die Photosynthese angeboten, so kann nicht ausgeschlossen werden, dass nebst markierten Assimilaten auch das radioaktive Substrat als solches aus dem Blatt abtransportiert wird. Dunkelfütterun-

Tabelle 2

Versuchsnummer	Fütterung erfolgte über	Fütterungsart	Spezifische Aktivität mC/ml	Fütterungszeit h	Bemerkung
10	2. Blatt	Lappen	20	2	
11	2. Blatt	Lappen	20	3	
14	2. Blatt	Lappen	20	6	
15	3. Blatt	Lappen	20	6	
16	2. Blatt	Lappen	20	10	anschliessend 14 h dunkel gestellt
17	2. Blatt	Lappen	20	6	Dunkelversuch
18	Wurzeln	—	20	5	Dunkelversuch
28	3. Blatt	Spitze	20	2	
29	3. Blatt	Spitze	20	5	
49	3. Blatt	Spitze	20	5	
50	3. Blatt	Lappen	20	5	
51	3. Blatt	Spitze	100	5	
52	3. Blatt	Spitze	20	1	
53	3. Blatt	Spitze	20	½	
54	3. Blatt	Spitze	20	2	partiell verdunkelt
55	3. Blatt	Spitze	20	2	Dunkelversuch
56	Wurzeln	—	20	2	Dunkelversuch
57	4. Blatt	Spitze	20	1	
58	4. Blatt	Spitze	20	2	
59	3. Blatt	Lappen	20	3	
60	3. Blatt	Spitze	20	3	
61	3. Blatt	Spitze	20	5	partiell verdunkelt
62	Wurzeln	—	20	1	Dunkelversuch
63	3. Blatt	Spitze	20	2	partiell verdunkelt

gen gestatten, die Aktivitätsverteilung bei geringerer spezifischer Aktivität der transportierten Assimilate und gleichbleibendem (Blattfütterung) oder gesteigertem Wasserabtransport (Wurzelfütterung) zu untersuchen, und können somit Hinweise über Grössenordnung und Auswirkung des Wassertransportes geben.

Für alle Dunkelfütterungen wurden die Pflanzen am Vorabend des Versuches in den Dunkelraum gestellt. Die notwendigen Operationen (Anbringen des Fütterungsgefässes, Ernte) wurden bei Rotlicht ausgeführt. Bei Versuchen mit partieller Verdunkelung (Fütterungsgefäss und 2–3 cm Blatt mit Alu-Folie abgedunkelt) wurden die Pflanzen nach Installation der Fütterungsvorrichtung in den Lichtraum gestellt.

Über Anatomie und Morphologie des Maises gibt es einige umfassende Untersuchungen (Hayward, 1938; Sharman, 1942; Esau, 1943). Die darin verwendeten Begriffe und Bezeichnungen wurden dieser Arbeit zu Grunde gelegt.

Den Versuchspflanzen (Abb. 6) wurden an folgenden Orten Gewebeproben entnommen und untersucht: Lamina des Fütterungsblattes (4–5 Proben in 1–2 cm Abstand), 3./4. Blatt, 2./3./4. Blatt, Koleoptile; bei Wurzelfütterungen zusätzlich 1. Internodium und Hauptwurzel 1–2 cm unterhalb des Kotyledonarknotens. Die Präparate der nassen Autoradiographie wurden nach folgenden Beurteilungskriterien bewertet:

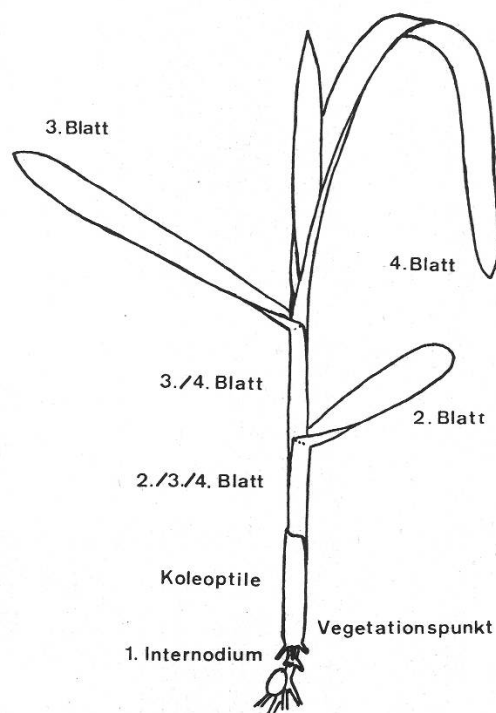


Abbildung 6

Maispflanze im Zeitpunkt des Versuches. Der Vegetationspunkt liegt knapp über dem ersten Internodium. Das sechste Blatt ist ungefähr gleich lang wie die Koleoptile

Erfassungsgrenze (0-1): Die Aktivität ist manchmal knapp über dem Hintergrund, oft auch darunter.

Deutliche Aktivität (1): Die Aktivität ist jederzeit deutlich über dem Hintergrund.

Starke Aktivität (2): Die einzelnen Punkte sind meist deutlich unterscheidbar. Es treten noch kaum durch hohe Aktivitätskonzentration verursachte Nachweisverluste auf.

Sehr starke Aktivität (3): Die Schwärzungspunkte sind so dicht beieinander, dass sie häufig nicht mehr unterscheidbar sind. Starke Nachweisverluste durch Überdeckung und Überschneidung.

b) Aktivitätsverteilung in der Fütterungszone

Wasserunlöslich eingebaute Aktivität:

In der Abbildung 7 ist der zeitliche Verlauf des Aktivitätsanstieges in den Geweben dargestellt. Im einzelnen Versuch kann die Verteilung vom Schema abweichen, die Kurven wollen nur Tendenzen angeben.

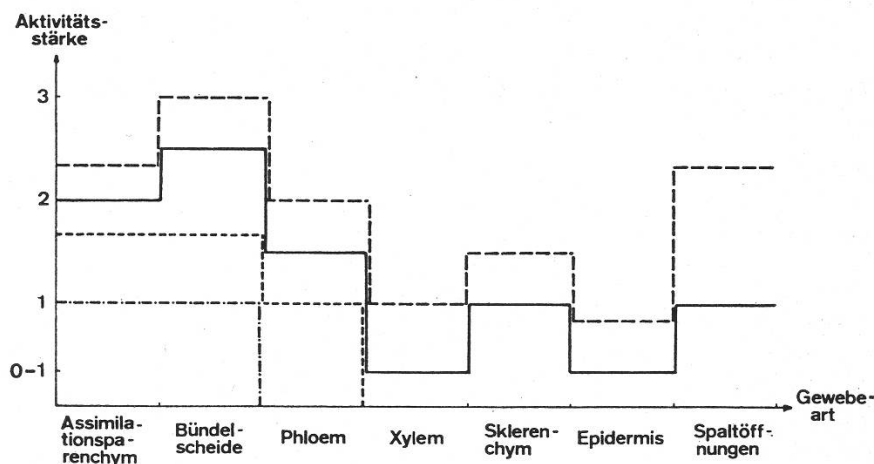


Abbildung 7

Aktivitätsverteilung in der Fütterungszone nach 30 min (---), 1 h (.....), 2 h (—) und 5 h (—) Fütterung

Die Schwärzung ist streng den Zellstrukturen zugeordnet: Im Assimilationsparenchym und in der Bündelscheide erscheint sie bevorzugt über Chloroplasten lokalisiert, jedoch weist auch das Plasma Aktivität auf. Im Phloem sind Sieb- und Geleitzellen gleich stark markiert. Bei den 5-h-Versuchen sind die Siebplatten auffällig stark aktiv (Abb. 8,9). Die Epidermis über dem Sklerenchym gehört physiologisch zum Sklerenchym. Die Schliesszellen des Spaltöffnungsapparates scheinen im Stoffwechsel von den übrigen Geweben weitgehend unabhängig zu sein: Ihr

Aktivitätsanstieg zeigt wenig Zusammenhang mit den andern Geweben, lässt sich durch äussere Faktoren (Abdunkeln, Fütterungsart) kaum beeinflussen und ist in gewissen Grenzen eine Funktion der Zeit.

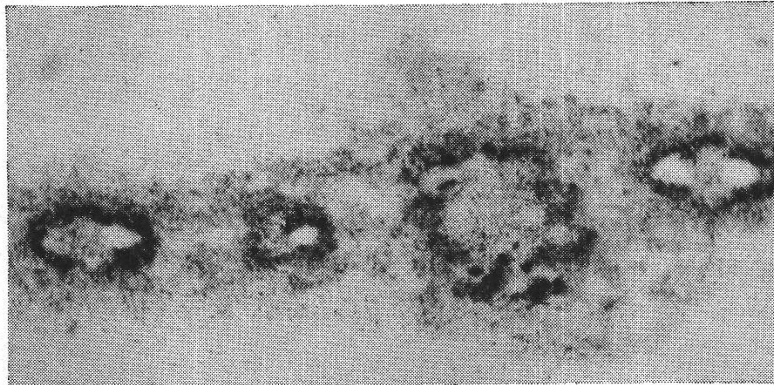


Abbildung 8

Aktivitätsverteilung in der Fütterungszone, Übersicht. Versuch 51. Vergrößerung 200mal

Totalaktivität:

Die Schwärzung ist ungefähr doppelt so stark. Schon nach 30 min Fütterung enthalten alle Gewebe Aktivität. In den 5-h-Versuchen ist die

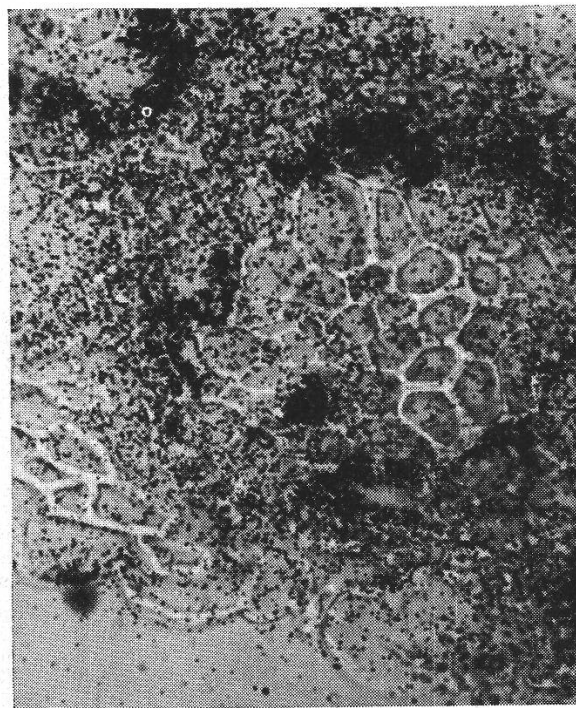


Abbildung 9

Fütterungszone. Versuch 51. Die Bündelscheide ist stark aktiv. Im Phloem fällt eine auffällig kräftig markierte Siebplatte auf. Vergrößerung 600mal

Epidermis ebenso stark markiert wie das Parenchym, oft sogar wie die Bündelscheide. Das Xylem weist die schwächste Aktivität auf in allen Versuchen.

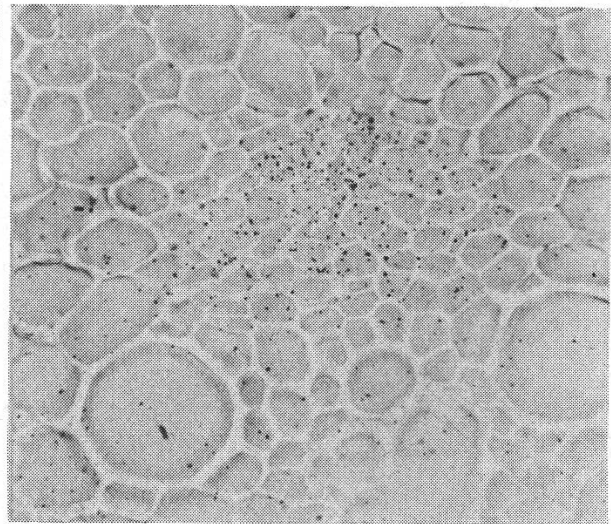
c) Abwärtstransport in der Lamina des Fütterungsblattes

Wasserunlöslich eingebaute Aktivität:

Auf die Fütterungszone folgt eine 1–2 cm lange Übergangsstrecke, wo die Aktivität bei kurzzeitigen Fütterungen (weniger als 2 h) in allen Geweben unter die Erfassungsgrenze sinkt, bei länger dauernden Versuchen nur noch in den Siebteilen des Hauptbündels und einiger lateraler Bündel erhalten bleibt (Abb. 10, 11). In den 2-h-Versuchen lässt sich im untern Teil der Lamina keine Aktivität mehr nachweisen, erst in der Blattscheide wieder (Abb. 12). Je höher das Aktivitätsniveau in der Fütterungszone, desto mehr laterale Bündel zeigen Phloemmarkierung. In Versuch 51 hatten je zwei an das mediane Bündel anschliessende intermediäre Bündel Phloemaktivität. Ebenso war das untere Sklerenchym (Blattunterseite) des Hauptbündels schwach markiert.



10



11

Abbildung 10

Basis der Lamina des Fütterungsblattes. Wasserunlösliche Aktivität. Versuch 51. Unten im Phloem wurde im Querschnitt eine Siebplatte getroffen. Vergrößerung 600mal

Abbildung 11

Basis der Lamina des Fütterungsblattes. Medianes Bündel, wasserunlösliche Aktivität. Versuch 16. Vergrößerung 600mal

Bei Fütterung des zweiten Blattes ist im medianen Bündel das untere Sklerenchym ebenso stark markiert wie das Phloem. In keinem Experiment zeigen die Sklerenchyme anderer Bündel Aktivität.

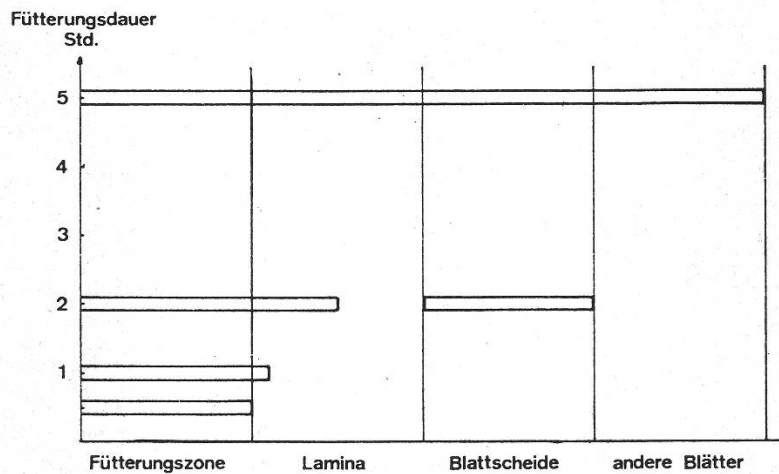


Abbildung 12

Verbreitung der wasserunlöslichen Aktivität nach verschiedenen langen Fütterungszeiten

Totalaktivität:

Schon nach halbstündiger Fütterung enthält die Lamina in allen Geweben Aktivität, wenn auch an der Erfassungsgrenze. Am unsichersten markiert sind das Grundparenchym der Mittelrippe und das Xylem. Auch in langzeitigeren Versuchen ändert sich das Verteilungsbild nicht mehr wesentlich, einzig das Aktivitätsniveau steigt kräftig an, und das Xylem ist kaum mehr schwächer aktiv als die übrigen Gewebe.

d) Abwärtstransport in der Blattscheide des Fütterungsblattes

Wasserunlöslich eingebaute Aktivität:

Die Aktivitätsverteilung in den Geweben der Blattscheide ist nicht in jedem Abschnitt gleich. Einige typische Verteilungsbilder sind in der Abbildung 13 zu sehen. In einer unterschiedlich langen Übergangszone ist die Schwärzung noch gleich verteilt wie in der Lamina. Dann zeigen zuerst die Sklerenchyme steigende Aktivität. Etwas weiter abwärts folgen praktisch gleichzeitig Parenchym, Bündelscheide und Epidermis. Im Xylem lässt sich zuletzt und erst gegen die Blattbasis Aktivität nachweisen. Gleichzeitig mit dem Auftauchen in andern Geweben breitet sich die Aktivität von einem medianen Schwerpunkt lateral aus und ist schließlich über den ganzen Schnitt feststellbar. Die Schwärzungen werden gegen die Blattbasis hin in allen Geweben intensiver, das Phloem ausgenommen, wobei sich die anfänglichen Niveauunterschiede immer mehr ausgleichen.

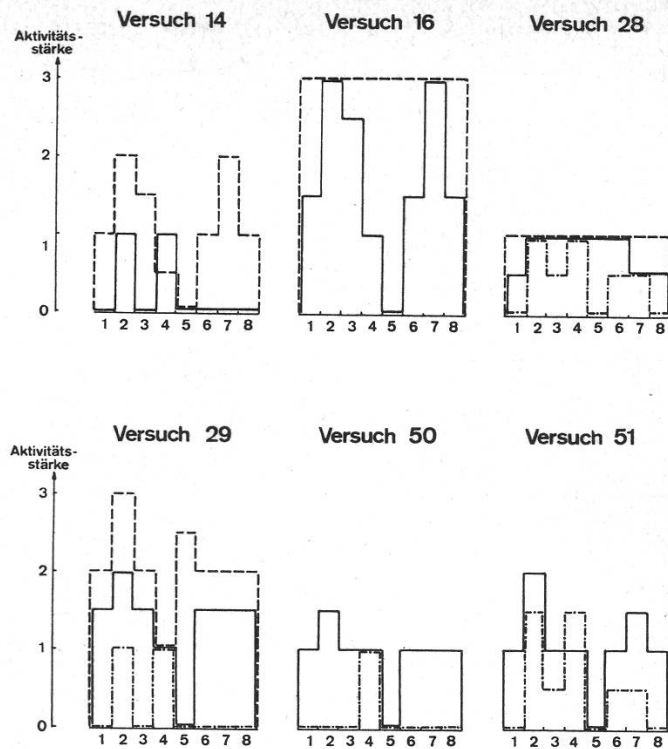


Abbildung 13

Verteilung der wasserunlöslichen Aktivität in der Blattscheide des Fütterungsblattes auf der Höhe des 3./4. Blattes (---), des 2./3./4. Blattes (—) und der Koleoptile (---). Die Ziffern auf der Abszisse bedeuten: 1 = untere Epidermis; 2 = unteres Sklerenchym; 3 = Bündelscheide; 4 = Phloem; 5 = Xylem; 6 = Parenchym; 7 = oberes Sklerenchym; 8 = obere Epidermis

Totalaktivität:

In den kurzzeitigen Versuchen (bis etwa 2 h) lässt sich nur in den Bündeln Aktivität nachweisen, und zwar vor allem im Phloem und Sklerenchym. Bei länger dauernden Versuchen stechen zwar immer noch die Bündelschwärzungen heraus, jedoch ist nun auch das Parenchym deutlich markiert. Das Xylem ist kaum mehr schwächer aktiv als die übrigen Bündelgewebe.

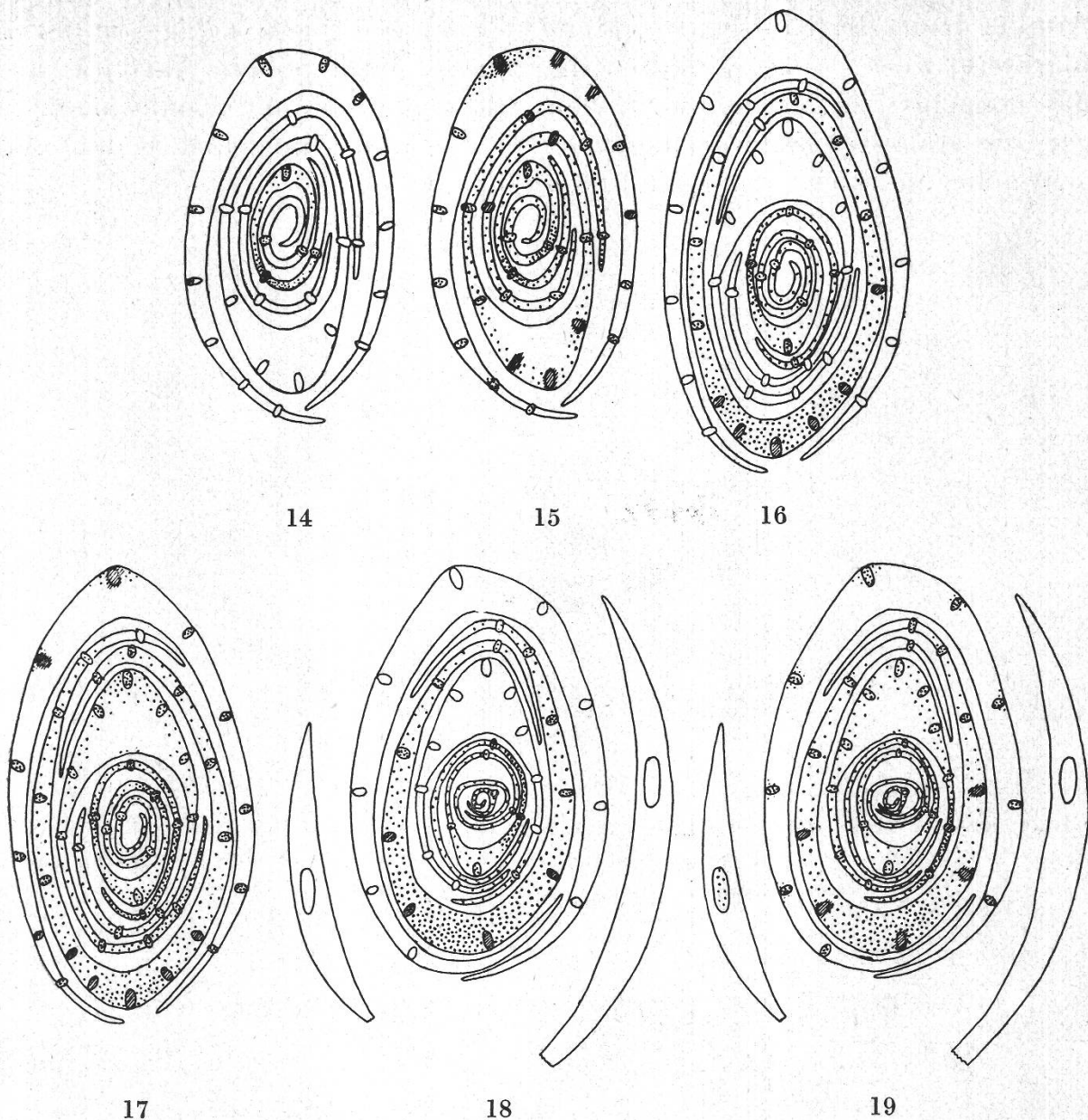
e) Eintransport der Aktivität in andere Blätter

Wasserunlöslich eingebaute Aktivität:

In keinem der Experimente fand ich wasserunlösliche Aktivität in Blättern, die älter als das Fütterungsblatt waren. Je jünger das Blatt, desto kräftiger baut es Aktivität ein. Oft liegt zwischen dem Fütterungsblatt und den jüngsten Blättern ein inaktives Blatt (Abb. 14).

Totalaktivität:

Schon nach 30 min Fütterung lässt sich Aktivität in sämtlichen Blättern nachweisen, die Koleoptile ausgenommen. In den länger dauernden



Abbildungen 14 bis 19

Querschnitte in der Höhe des 3./4. Blattes (Abb. 14 und 15), 2./3./4. Blattes (Abb. 16 und 17) und der Koeleoptile (Abb. 18 und 19). Versuch 29. Bei Abbildung 14, 16 und 18 handelt es sich um die Verteilung der wasserunlöslichen Aktivität, bei den übrigen Abbildungen um die Verteilung der Totalaktivität

Versuchen (2 h und mehr) zeigt auch die Koeleptile deutliche Aktivität in den Bündeln, später auch im Parenchym (Versuch 16).

f) Aufwärtstransport in der Blattscheide

Wasserunlöslich eingebaute Aktivität:

Sobald sich Aktivität erfassen lässt, ist sie schon über den ganzen Blattquerschnitt ausgebreitet. Bei jüngern Blättern liegt der Aktivitätsschwerpunkt oft lateral (Abb. 14, 15, 16) oder sogar gegen die Blattränder.

Auf der Höhe der Koleoptile sind die Gewebe mehr oder weniger uniform markiert, weiter oben enthalten die Bündel meist höhere Aktivität als das benachbarte Parenchym. Xylem, Sklerenchyme und Epidermis zeigen die stärksten Schwärzungen (Abb. 20), das Phloem ist bedeutend schwächer markiert, manchmal überhaupt nicht.

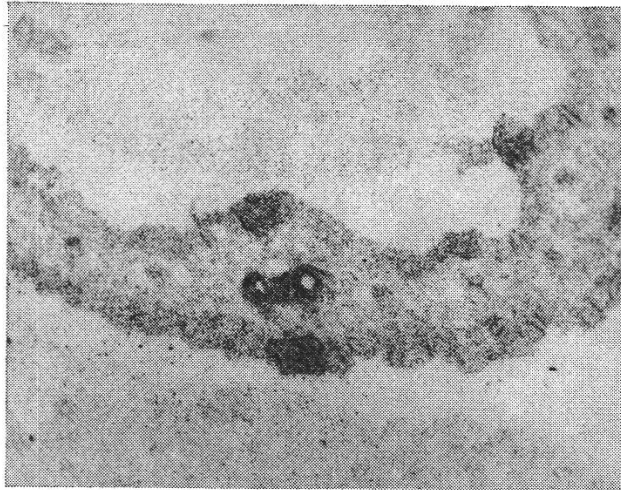


Abbildung 20

4. Blatt auf der Höhe des 3./4. Blattes, Versuch 16, wasserunlösliche Aktivität: Sklerenchym, Metaxylem und Epidermis am stärksten aktiv. Das 4. Blatt war von aussen noch kaum sichtbar. Vergrößerung 200mal

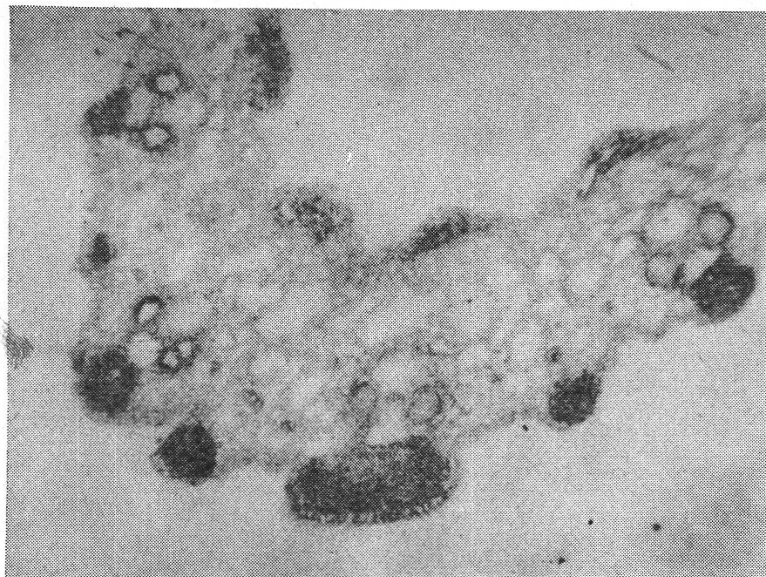


Abbildung 21

3. Blatt auf der Höhe des 2./3./4. Blattes, Versuch 15, wasserunlösliche Aktivität: Sklerenchym am stärksten aktiv, Metaxylem kräftiger markiert als Parenchym, Phloem praktisch inaktiv, fällt (nebst der Protoxylemlakune) als weisse Lücke auf. Vergrößerung 100mal

Totalaktivität:

Koleoptile: Die Aktivität bleibt auf das Bündel beschränkt. Nur in Versuch 16 zeigt auch das Parenchym teilweise Aktivität.

2. und 3. Blatt: In den kurzzeitigen Fütterungen (30 min, 1 h) weisen einzig die grossen Bündel Aktivität auf, und zwar im Phloem und im Sklerenchym (Abb. 22). Später (2 h) sind Xylemparenchym und Xylem ebenfalls leicht markiert, ebenso die intermediären Bündel und das Parenchym um die Bündel herum. Erst nach 5 h Fütterung zeigen Parenchym und Epidermis durchgehend Schwärzung, aber immer noch schwächer als die Bündel.

4., 5. und 6. Blatt: Alle Blattgewebe sind von Beginn an gleichmässig markiert. Bei längerer Fütterungsdauer steigt das Aktivitätsniveau in

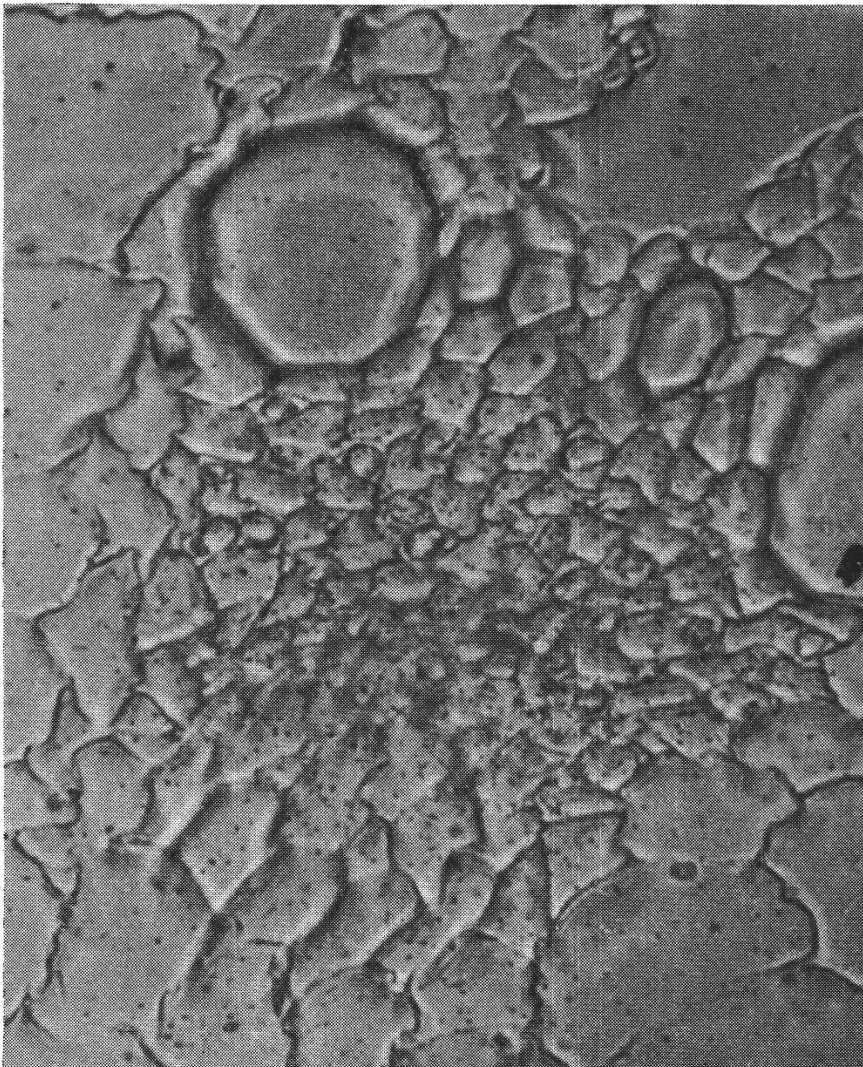


Abbildung 22

2. Blatt auf der Höhe der Koleoptile, Versuch 53, wasserlösliche Aktivität: Das auf dem Bild nicht sichtbare Sklerenchym ist ebenso stark aktiv wie das Phloem. Vergrösserung 600mal

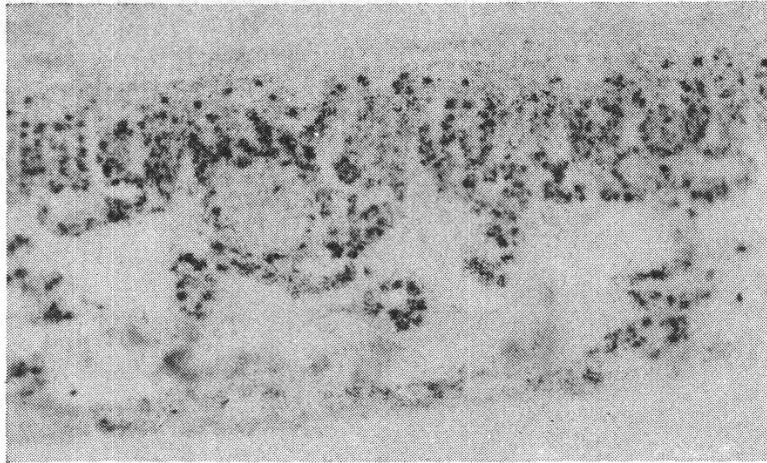


Abbildung 23

Kaffee, Fütterungsstelle. Blattspitzenfütterung 5 h, wasserunlösliche Aktivität. Vergrößerung 200mal

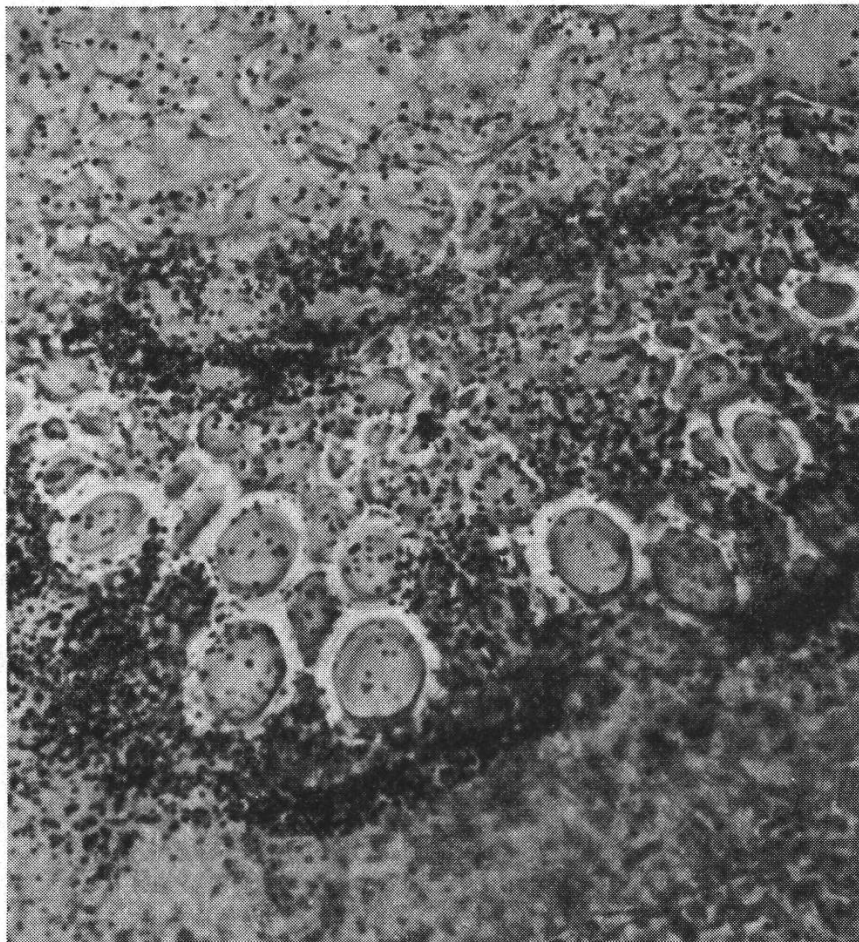


Abbildung 24

Kaffee, Fütterungsstelle, medianes Bündel. Blattspitzenfütterung 5 h, anschliessend 2 h im Dunkeln stehen gelassen, wasserunlösliche Aktivität. Die Markstrahlen, das jüngste Phloem und Xylem sind am kräftigsten markiert, das ältere Phloem (verschwommen) weniger stark aktiv. Vergrößerung 600mal

allen Geweben gleich stark. Das 4. Blatt nimmt eine Zwischenstellung ein: Seine Aktivitätsverteilung gleicht manchmal eher derjenigen des 3. Blattes.

g) Blattfütterung im Dunkeln

Wasserunlöslich eingebaute Aktivität:

Sie bleibt in allen Versuchen auf die Fütterungsstelle beschränkt. Die Verteilung ist gleich wie bei den Lichtfütterungen, das Aktivitätsniveau jedoch bedeutend tiefer, etwa so hoch, wie wenn bei Licht halb so lange gefüttert worden wäre. Bei partieller Verdunklung (nur Fütterungszone) ist die Aktivitätsfixierung eher etwas besser.

Totalaktivität:

Hier zeigt es sich deutlich, dass die Aktivitätsfixierung bei vollständiger Abdunklung stärker behindert ist als bei partieller. In allen Versuchen ist die Aktivität über die ganze Pflanze verbreitet, wobei die Verteilung genau gleich wie in den Lichtversuchen ist.

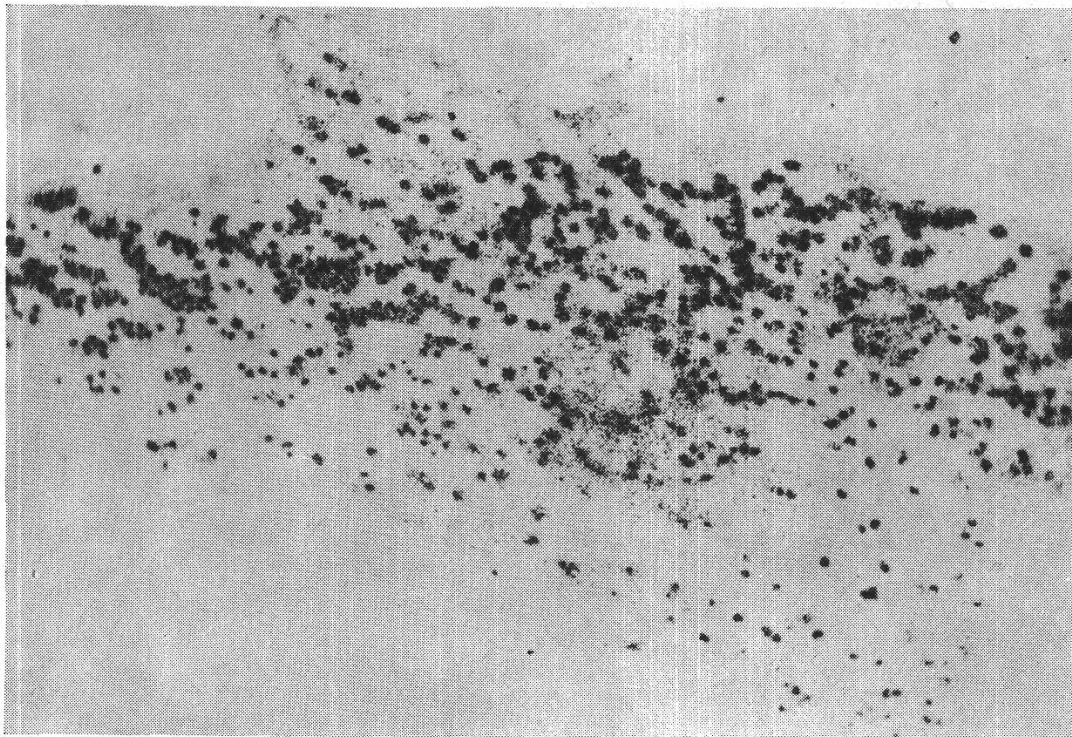


Abbildung 25

Phaseolus, Fütterungsstelle, medianer Nerv. Blattspitzenfütterung 5 h, wasserunlösliche Aktivität. Aktivität besonders deutlich auf Chloroplasten lokalisiert. Vergrößerung 200mal

h) Wurzelfütterung im Dunkeln

Wasserunlöslich eingebaute Aktivität:

Nur im 5-h-Versuch lässt sich in den untersuchten Gewebeproben Aktivität nachweisen. In der Wurzel (1 cm unterhalb des Kotyledonarknotens) sind Phloem und Xylem gleich stark markiert, etwas kräftiger als die Wurzelrinde und das Mark des Zentralzylinders. Zwischen Haupt- und Nebenwurzeln gibt es keine Unterschiede in der Schwärzungsintensität. Im ersten Internodium sind Aktivitätsverteilung und Intensität gleich wie in der Wurzel, jedoch sind die sprossbürtigen Wurzeln viel stärker aktiv als das erste Internodium. Auf der Höhe der Koleoptile sind sämtliche Blätter in allen Geweben gleichmässig markiert, die jüngsten Blätter am kräftigsten.

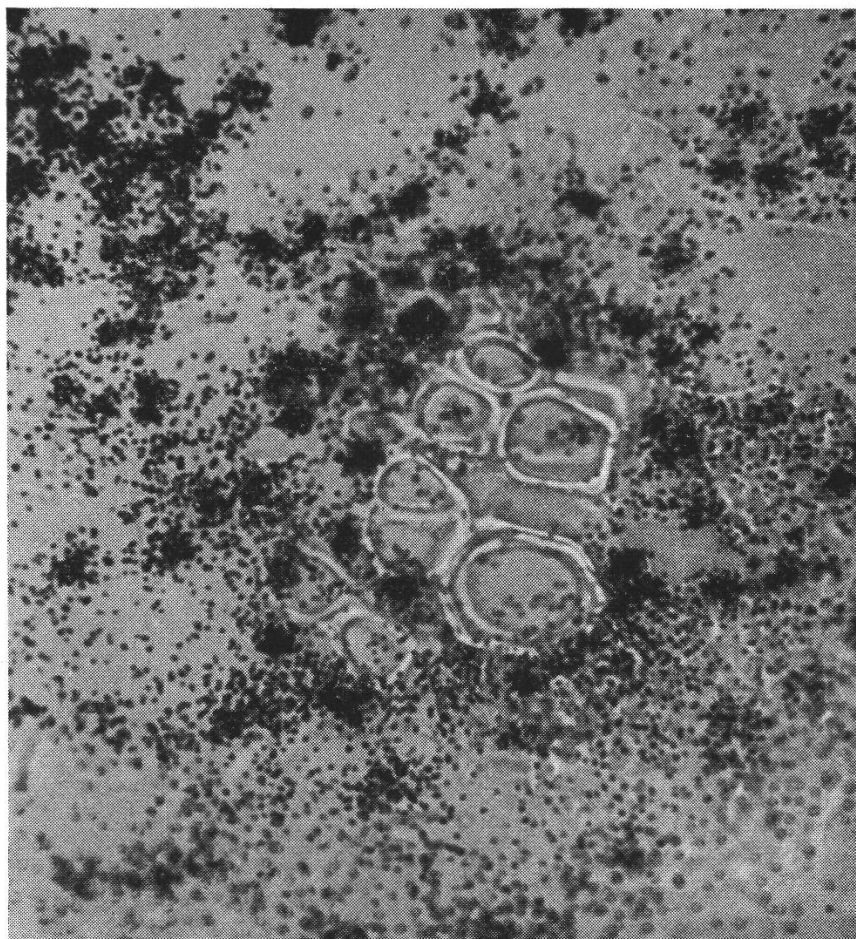


Abbildung 26

Phaseolus, Fütterungsstelle, medianes Bündel, gleicher Schnitt wie in Abbildung 25. Vergrößerung 600mal

Totalaktivität:

In den beiden kurzzeitigen Versuchen lässt sich in der Hauptwurzel (1 cm unterhalb Mais Kornansatz) keine sichere Aktivität nachweisen. Alle

Nebenwurzeln sind kräftig aktiv, vor allem im Zentralzylinder. Je höher oben die Nebenwurzeln ihren Ansatzpunkt haben (periphere Lage im Schnitt), desto intensiver ist die Schwärzung. Bei 1 h Fütterung zeigt der Zentralzylinder des ersten Internodiums keine sichere Aktivität. Im 2-h-Versuch ist vor allem die Rinde gegen den Zentralzylinder zu stark markiert, alle übrigen Gewebe bedeutend schwächer. Auf der Höhe der Koleoptile weisen sämtliche Blätter Aktivität auf, die jüngern mehr als die ältern, die Koleoptile am wenigsten.

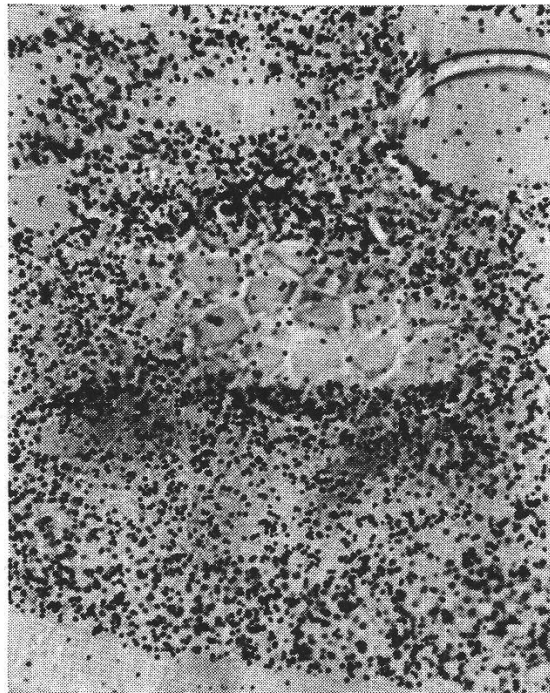


Abbildung 27

3. Blatt auf der Höhe der Koleoptile, Versuch 15, wasserunlösliche Aktivität. Das Blatt ist an dieser Stelle in voller Entwicklung begriffen. Nur das Protophloem ist fertig ausdifferenziert und weist dementsprechend kaum Aktivität auf. Am stärksten markiert sind das zukünftige Sklerenchym sowie das Metaxylem und Metaphloem bildende Gewebe (an das Protophloem anschliessend). Vergrößerung 600mal

Die Bündel und ihre Umgebung sind stärker markiert als das übrige Parenchym. Innerhalb der Bündel ist das Xylem schwächer aktiv als die andern Gewebe.

3. Transportuntersuchungen an *Coffea arabica* und *Phaseolus vulgaris*

a) Fütterungszone

Gegenüber den Maisblättern fällt die starke Aktivitätskonzentration um die Chloroplasten herum auf (Abb. 23–26). Sie ist offensichtlich der

Bildung von Stärke zuzuschreiben, denn bei Abdunklung des Blattes nach der Fütterung lösten sich diese Schwärzungshäufchen rasch auf und wurden in die übrige Schwärzung integriert. Die Epidermis von Coffea ist ebenfalls kräftig aktiv, was nicht überrascht, enthält sie doch im Gegensatz zur Maisepidermis Chloroplasten. Im Bündel sind die Markstrahlen und das junge Xylem am stärksten markiert (Abb. 24). Infolge der langen Fütterungszeiten (5 h) lassen sich keine Schlüsse über den Transportweg ziehen. Kaffeeblätter, die im Dunkeln gefüttert wurden (5 h, 10 h), nahmen praktisch keine Aktivität auf.

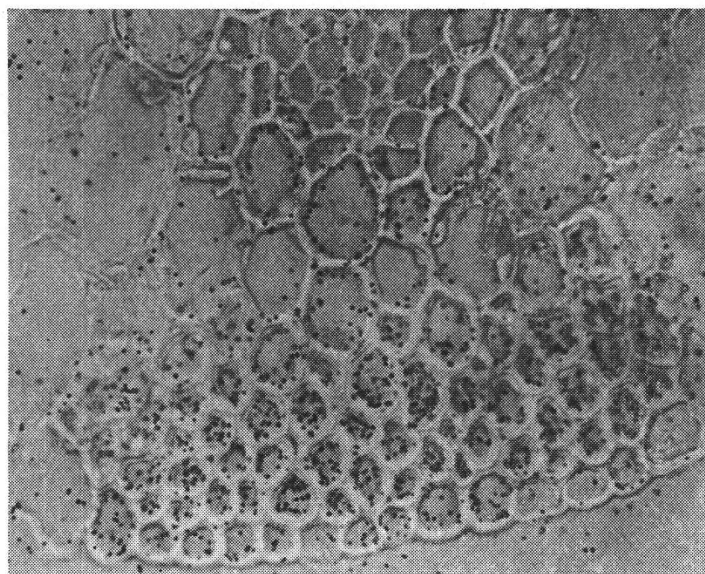


Abbildung 28

2. Blatt auf der Höhe des 2./3./4. Blattes, Versuch 16, wasserunlösliche Aktivität. Vergrößerung 600mal

b) Übriges Blatt

Die wasserunlösliche Aktivität beschränkt sich ausschliesslich auf die Fütterungszone und unmittelbar benachbarte Gewebepartien (alles 5-h-Fütterungen, anschliessend 0, 2, 5, 10 h im Dunklen stehen gelassen). Auch die Totalaktivität sinkt gegen die Blattmitte zu unter die Erfassungsgrenze. Spitzenwärts ist sie sehr diffus verteilt. Offensichtlich ist die Fütterungszone für so grosse Blätter zu klein, die Aktivität sinkt darum ausserhalb der eingetauchten Blattspitze rasch unter die Erfassungsgrenze.

IV. Diskussion

1. Mikroautoradiographie und Transportuntersuchungen

Die Mikroautoradiographie wäre eine ideale Methode für Transportlokalisationen, wenn in der Pflanze assimilattransportierende und assimilatverbrauchende Gewebe räumlich streng getrennt wären. Nicht einmal bei ausgewachsenen Organen ist diese Forderung vollständig erfüllt. Wachsende und speichernde Gewebe sowie Zellen mit hohem Energiebedarf sind potentielle Assimilatableiter. Aktivität im autoradiographischen Bild bedeutet daher noch lange nicht, dass die betreffenden Gewebe Transportkanäle sind. Je kurzzeitiger der Versuch, je schärfer die Aktivitätsfront, je empfindlicher ihr Nachweis, desto eher sollten nur transportierende Gewebe Schwärzungen aufweisen.

In bezug auf ihr Verhalten zu Assimilaten können grob dreierlei Gewebekategorien unterschieden werden: Transportkanäle für den Ferntransport von Assimilaten, ausgewachsene Gewebe, wachsende und speichernde Gewebe. Die Transportkanäle werden in einer ersten Phase die höchste Aktivitätskonzentration aufweisen. Je stärker die Verluste an die Umgebung, desto rascher erfolgt der Konzentrationsausgleich. Ausgewachsene Zellen sind vor allem Produktionsorte, sie haben Überschuss an Assimilaten und werden den Leitgeweben verhältnismässig wenig Aktivität entziehen. Einbau in wasserunlösliche Substanzen findet kaum statt. Wachsende und speichernde Gewebe sind die bevorzugten Ziele des Assimilatstromes. Sie nehmen rasch Aktivität auf und akkumulieren sie in wasserunlöslichen Verbindungen, die wachsenden Zellen in Proteinen und Wandsubstanzen, die Speicherzellen in Polysacchariden. Es muss wegen der Akkumulation damit gerechnet werden, dass solche Gewebe nach kurzer Zeit intensivere Schwärzungen aufweisen als die Transportbahnen. Die getrennte Untersuchung der wasserlöslichen und wasserunlöslichen Aktivität kann hier wichtige Hinweise geben.

In gewissen Grenzen ist es auch möglich, auf mikroautoradiographischem Weg Transportgeschwindigkeiten zu bestimmen. Es werden dabei nur Minimalwerte erhalten. Je rascher der Tracer ins Blatt gelangt, dort in Assimilate eingebaut wird und je empfindlicher der Aktivitätsnachweis, desto schneller ist die spezifische Aktivität der Assimilate in den Leitgeweben genügend hoch für den Nachweis und damit der erhaltene Wert der wirklichen Transportgeschwindigkeit am nächsten.

2. Vor- und Nachteile von THO als Tracer für Transportuntersuchungen

Es muss zwischen der technischen Seite (Mikroautoradiographie) und der physiologischen Seite des Problems unterschieden werden. Da die

technischen Vor- und Nachteile schon unter dem Abschnitt «Methodische Ergebnisse» ausführlich besprochen wurden, beschränke ich mich in diesem Abschnitt auf die physiologischen Probleme. Es sind hauptsächlich drei, die ins Gewicht fallen: a) Die Traceraufnahme erfolgt relativ langsam. b) Wasserstoffbindungen mit Sauerstoff und Stickstoff sind labil. Aus diesem Grund sind auch unspezifische Markierungen möglich. c) Der Tracer kann als Wasser aus dem Blatt abwandern.

a) Geschwindigkeit des Wasseraustausches

Vaadia (1963) beobachtete, dass in THO-Wasser eingetauchte Sonnenblumenblätter für den Wasseraustausch eine Halbwertszeit von 1 h haben (Innenkonz. 50% der Aussenkonz.). Nach 3 h betrug die THO-Konzentration im Blatt 80% der Aussenkonzentration. Wurde das flüssige THO durch dampfförmiges ersetzt, war der Austausch 10% in 3 h. Für Pinusnadeln waren die Halbwertszeiten doppelt so lang. Vartapetyan (1961) mass mit DHO-Dampf an Bohnenblättern eine Halbwertszeit von 8 h. Die Versuche von Ordin (1956) mit 5 mm dicken Koleoptilzylindern und flüssigem DHO zeigen deutlich, dass die Kutikula für diese langen Halbwertszeiten verantwortlich ist: Er beobachtete an seinem Objekt Halbwertszeiten von 8–10 min. Gegenüber freier Diffusion in Wasser beträgt der Diffusionskoeffizient trotzdem nur 1% (Philip, 1958), bezogen auf die Sonnenblumenblätter sogar nur 1‰. Dagegen gestatten die Spaltöffnungen eine sehr hohe Diffusionsgeschwindigkeit für CO₂. Das Verhältnis Innen-/Aussenkonzentration ist beinahe 1 (Hill, 1961). Dieser Vergleich lässt befürchten, dass die spezifische Aktivität der Assimilate langsamer ansteigt bei Verwendung von THO anstelle von C¹⁴O₂. Das bedeutet, dass die Aktivitätsfront unschärfer verläuft. Zusammen mit der geringeren Ausbeute im mikroautoradiographischen Nachweis dürfte dies für den zögernden Schwärzungsanstieg und die flachen Aktivitätsverteilungen verantwortlich sein.

b) Tritiumeinbau in organische Verbindungen bei Verwendung von THO als Tracer der Photosynthese

C¹⁴O₂ kann primär in Ribulose-diphosphat und Phosphoenolpyruvat eingebaut werden und tritt erst durch stufenweisen Umbau in andere organische Verbindungen ein. Für THO liegen die Verhältnisse viel komplizierter. Es gibt zweierlei Wasserstoffbindungen: labile mit Sauerstoff und Stickstoff, stabile mit Kohlenstoff. Labil gebundene Wasserstoffatome sind dadurch gekennzeichnet, dass sie untereinander leicht die Plätze tauschen. Da Tritium im Wassermolekül labil gebunden ist, kann es seinen Platz mit inaktiven, labil gebundenen Wasserstoffatomen organischer Verbindungen tauschen. Auf enzymatischem Weg kann es in

eine nichtaustauschbare Position gelangen und geht dann bei der Gewebepräparation nicht mehr verloren durch Rückaustausch mit labil gebundenen Wasserstoffatomen des Alkohols. Von THO aus gibt es ferner drei verschiedene Wege für spezifischen Einbau mit Hilfe von Enzymen: Bei der Photolyse werden die Phosphopyridinnukleotide (DPN, TPN) reduziert, wobei Wasser als Wasserstofflieferant dient. In einer grossen Zahl enzymatischer Reduktionsprozesse stammt der Wasserstoff aus DPNH oder TPNH. Daneben gibt es auch enzymatisch gesteuerte Wasseranlagerungsreaktionen (z. B. Malat/Fumarat), wo das Wasser als ganzes Molekül in eine organische Verbindung eintritt. Eine nicht unerhebliche Rolle spielen enzymatische Hydrolysen. Durch Reduktions- und Wasseranlagerungsprozesse gelangt der Wasserstoff sowohl in labile wie stabile Positionen, während er bei Hydrolysen allein in austauschbare Bindungen gerät. Beim weiteren Umbau der Verbindungen können labil gebundene Wasserstoffatome in nichtaustauschbare Positionen wechseln und umgekehrt. Über das Gewicht, das den einzelnen Einbauvorgängen im ganzen zukommt, kann nur das Experiment Auskunft geben.

Moses und Calvin (1959) fanden, dass Tritium bei der Photosynthese von *Chlorella* im wesentlichen in die gleichen Verbindungen eingebaut wird wie C^{14} , wenn auch mit anderer prozentualer Verteilung. In Dunkelversuchen war der Einbau nur um einen Drittel kleiner als im Licht. Simon und Trebst (1961) schliessen aufgrund ihrer Versuche, dass der überwiegende Teil der stabilen C-T-Bindungen nicht durch Reduktionsreaktionen entsteht. In einer späteren Arbeit (Simon, 1964) untersuchten sie auch die intramolekulare T-Verteilung und schlossen, dass der T-Einbau vor allem durch Isomerisationsprozesse zustande kommt. Beidemal untersuchten sie auch das Verhältnis von T- zu C^{14} -Einbau bei gleichzeitiger Fütterung beider Tracer. Es wird, auf den Gesamteinbau bezogen, mehr Tritium eingebaut als C^{14} (T/C-Substanz:T/C-Substrat). Dass die gefundenen Verhältniszahlen teilweise kleiner als erwartet waren, schreiben die Autoren den grossen Isotopeneffekten zu, welche die Gleichgewichtseinstellung verlangsamten. Sowohl Moses wie Simon untersuchten ausschliesslich die stabilen H-Bindungen. Ihre Ergebnisse sind nicht ohne weiteres auf Transportuntersuchungen übertragbar, weil sie in geschlossenen Systemen arbeiteten.

Für Transportuntersuchungen ist vor allem wichtig, dass die eigentlichen Transportverbindungen möglichst rasch markiert werden. Bei Mais handelt es sich wie bei den meisten Pflanzen um Saccharose (Loomis, 1945) und in beschränkterem Umfang um Aminosäuren. Saccharose gehört laut Simon (1964) zu den Verbindungen mit besonders raschem T-Einbau (T/C-Verhältnis nach 10 min = 1,10, bei 20 min Vorinkubation = 1,80). Die langsamere THO-Aufnahme dürfte also durch den schnelleren Einbau in die wichtigste Transportverbindung teilweise kompensiert werden.

siert werden. Nebst stabilen C-T-Bindungen wird die Saccharose auch O-T-Bindungen aufweisen. Beim Transport werden solche labile T-Atome abwechslungsweise an stationären Zellinhalten hängenbleiben und wieder mitgenommen werden, vergleichbar dem Vorgang in einer Fraktionierkolonne. Einzelne festgehaltene T-Atome werden an Ort und Stelle in stabile Bindungen übergeführt und bleiben dem Weitertransport und später dem Rückaustausch mit Alkohol entzogen.

c) Wasserabtransport aus dem Blatt

Mit THO wird nicht nur bilanzmässig feststellbarer Wasserabtransport registriert (= negativer Wassertransport). Auch Wasserzirkulation bei positiver Bilanz für das Blatt manifestiert sich mit THO auf dieselbe Weise wie Wasserabtransport.

Über den negativen Wassertransport weiss man, dass er nur bei einem Wasserdefizit in der Pflanze und gleichzeitiger reichlicher Wasserversorgung eines Blattes vor sich gehen kann. Entsprechende Nachweise lieferten Haines (1952, 1953) und Slatyer (1956). Auch wenn ein negativer osmotischer Gradient besteht, ist die Geschwindigkeit des Wasserabtransportes gering: Abgeschnittene Blätter, die umgekehrt in Wasser eingetaucht werden, welken hart an der Benetzungsgrenze (Wetzel, 1924). Der begrenzende Faktor scheint in der Wasseraufnahme (Kutikularwiderstand) zu liegen (Slatyer, 1960). Bei reichlicher Wasserversorgung und Transpiration der Blätter ist ein negativer Wasserabtransport nicht zu befürchten.

Dass auch unter normalen Verhältnissen Wasser aus dem Blatt abwandert, konnte mit THO gezeigt werden (Biddulph, 1957; Aronoff, 1958; Vaadia, 1963). Alle drei Autoren beobachteten nur geringen Wasserabtransport. Biddulph (1957) fand für THO hohe seitliche Verluste an die umgebenden Gewebe. Aronoff (1958) fütterte Cucurbitablätter mit THO und untersuchte das Verhältnis zwischen THO und T-Assimilaten in Blättern und Stengeln. Während im Fütterungsblatt rund 50mal mehr THO als T-Assimilate vorhanden ist, ändert sich dieses Verhältnis im Stengel radikal zugunsten der T-Assimilate (100–1000mal mehr).

Bei der Gefriersubstitution werden die Gewebe entwässert und damit auch freies THO entfernt. Der Wasserabtransport könnte nur indirekt das mikroautoradiographische Bild beeinflussen, falls abgewandertes Wasser stabil in organische Verbindungen eingebaut würde. Bei der starken Verdünnung und dem geringen Abtransport ist kaum zu befürchten, dass dies in stärkerem Mass geschieht.

Um sicher zu gehen, dass der Wasserabtransport und die damit verbundene indirekte Markierung in einer andern Grössenordnung liegen als der

Assimilattransport und mikroautoradiographisch nicht erfassbar sind, wurden in den Grenzen der methodischen Möglichkeit eigene Versuche unternommen. Die Wurzelfütterungen im Dunkeln bezweckten, das Aktivitätsverteilungsbild bei maximalem Wassertransport und möglichst geringem Assimilattransport zu prüfen. Wenn der Wassertransport sich durch starke Markierungen bemerkbar machen würde, so müsste unter diesen Versuchsbedingungen ein wesentlich anderes Verteilungsbild entstehen als bei Überwiegen des Assimilattransportes. Vor allem sollten die eigentlichen Wasserleitbahnen stärker markiert sein. Die Ergebnisse der Wurzel- und Blattfütterungsversuche unterscheiden sich kaum, abgesehen vom relativ höheren Aktivitätsniveau bei den Wurzelfütterungsversuchen: Die Aktivität befindet sich in erster Linie in jungen Geweben und im Phloem. Es ist auffällig, wie die Hauptwurzel und die Koleoptile wenig oder überhaupt keine Aktivität aufweisen. Die Nebenwurzeln sind kräftig aktiv, sogar noch bei der Einmündung in die Hauptwurzel, während diese nur unsichere Schwärzung zeigt, was vermuten lässt, dass die Nebenwurzeln keine Assimilate exportieren. Die Ergebnisse lassen sich nur so deuten, dass das Wasser zuerst ins Mesophyll gelangt, dort in Assimilate eingebaut wird, die je nach Entwicklungsstand der Gewebe entweder abgegeben oder selbst verwendet werden.

Den Versuchen mit partieller Abdunklung des Fütterungsblattes lag die Idee zugrunde, dass ein deutlicher Wasserabtransport aus der Fütterungszone sich in einem starken Schwärzungsunterschied an der Grenze hell/dunkel äussern müsste, weil im Licht dreimal mehr Aktivität fixiert wird (Moses, 1959). Ein solcher Unterschied konnte nicht festgestellt werden. Das Ergebnis lässt sich nur erklären, wenn man eine alleinige, durch Abdunklung behinderte Aktivitätsfixierung in der Fütterungszone annimmt, mit einem Abtransport, der aus dieser Quelle gespiesen wird.

3. Ort der Wasseraufnahme ins Blatt

Die Beobachtung, dass xeromorphe Blätter langsamer Wasser aufnehmen als mesomorphe (Steubing, 1949; Vaadia, 1963) spricht für eine Wasseraufnahme durch die Kutikula. Wetzel (1924) verneint eine Beteiligung der Spaltöffnungen an der Wasseraufnahme, obwohl er feststellte, dass stundenlang in Wasser getauchte Blätter offene Spaltöffnungen aufweisen. Dagegen beobachtete Vaadia (1963) niedrigere Austauschwerte, wenn die Fütterungsblätter ein Wasserdefizit aufwiesen. Er erklärt dies als Folge der geschlossenen Spaltöffnungen und vermutet eine stomatare Kontrolle der Wasseraufnahme.

Kaffeeblätter nahmen bei Dunkelfütterung praktisch keine Aktivität auf. Mais dagegen zeigte keine Behinderung der Wasseraufnahme; das etwas

tiefere Aktivitätsniveau lässt sich zwangslos mit der geringeren Aktivitätsfixierung im Dunkeln erklären. Diese Ergebnisse sind nur schwer verständlich, wenn nicht bei *Coffea* die Spaltöffnungen eine entscheidende Rolle bei der Wasseraufnahme spielen.

4. Die Lokalisation des Assimilattransportes

Ein direkter Beweis, dass bei Mais Aufwärts- und Abwärtstransport der Assimilate im Phloem stattfinden, ist aufgrund meiner Ergebnisse nicht möglich: sogar in den kurzzeitigen Versuchen ist in den Blattscheiden nebst dem Phloem gleichzeitig auch das Sklerenchym markiert; der Aktivitätsnachweis in der Lamina war unsicher und gelang nur sporadisch, was vermutlich dem Konzentrationsausgleich mit dem Mesophyll zuzuschreiben ist. Zwei Deutungen scheinen mir möglich: 1. Phloem und Sklerenchym bilden zusammen das Transportsystem. 2. Das Phloem ist alleiniger Transportkanal, das Sklerenchym dagegen aus irgendwelchen Gründen ein Ort stärksten Assimilatbedarfs. Wenn die Nachweismethode genügend empfindlich wäre, würde im zweiten Fall bei noch kürzeren Versuchszeiten einmal der Moment eintreten, wo an der Front das Phloem allein markiert wäre. Alles spricht dafür, dass bei THO-Fütterung die Assimilatfront sehr diffus verläuft und die Nachweismethode zu unempfindlich ist. Als Folge davon spielt sich wahrscheinlich der Austausch zwischen Phloem und Sklerenchym unter der Nachweisschwelle ab, eine Auflösung zwischen Transport und Austausch wäre in diesem Fall nicht möglich; auch wenn eine solche Auflösung gelingen würde, könnte das Ergebnis doch noch als rascher Phloemtransport und langsamerer Sklerenchymtransport interpretiert werden. Aussichtsreicher für eine vernünftige Deutung scheint mir, von der Anatomie und Physiologie des Maissklerenchyms auszugehen.

In der Lamina geben die Sklerenchyme eine starke Ligninreaktion, Kern und Plasma scheinen zu fehlen. Dagegen sind in den Sklerenchymen der Blattscheiden, vor allem im unteren Teil, Kern wie Plasma noch vorhanden. Die Zellwände geben, obwohl schon beachtlich dick, nur schwache oder keine Ligninreaktion. Auch Zellen mit deutlicher Ligninreaktion besitzen Kern wie Plasma. Offensichtlich gehört die Ligninbildung des Sklerenchyms zu den allerletzten Reifungsprozessen des ausgewachsenen Blattes. Nach Sharman (1942) schreitet die Alterung der Maisblätter von der Spitze basal vorwärts. Die Blattscheide ist später ausgewachsen als die Lamina. Das Längenwachstum und auch das Streckungswachstum eines Blattes sind abgeschlossen, sobald das Metaxylem lignifiziert ist. Nachher sind nur noch Ausreifungsprozesse möglich. Wandverdickung und Lignifizierung beim Sklerenchym gehören zu diesen Reifungsvorgängen. Sie sind vor allem in der Blattscheide und

dem untern Teil der Lamina beim Aufhören des Wachstums noch nicht abgeschlossen und hinken hinter der frühzeitigen Ausgestaltung des Metaxylems nach. Entsprechend bleiben im Sklerenchym Kern und Plasma noch lange erhalten.

Die Intensität des Aufbaus wasserunlöslicher Aktivität zeigt erstaunliche Parallelität mit dem Fortschreiten des Reifungsprozesses: In der Blattbasis (= wachsende Zone) sind alle Gewebe gleichmässig stark markiert. Weiter aufwärts dominieren aktivitätsmässig zuerst Metaxylem, Epidermis und Sklerenchym (Abb. 21). Allmählich gehen die Schwärzungen in Metaxylem, Epidermis, Parenchym und Bündelscheide verloren, erst zuletzt im Sklerenchym (Abb. 28). Je nach Entwicklungsstadium und Aktivitätsniveau des Blattes gelingt der Aktivitätsnachweis im Sklerenchym bis in die Lamina hinauf. Es ist auffallend, wie in der Blattspitze, obwohl sie in THO eintaucht und ein sehr hohes Aktivitätsniveau aufweist, das Sklerenchym erst spät und wenig wasserunlösliche Aktivität enthält. Die wasserunlösliche Aktivität entsteht erst sekundär durch Umbau der wasserlöslichen Assimilate, wobei wahrscheinlich dem glycolytischen Abbau eine Schlüsselposition zukommt. Gradwohl (1965) untersuchte Maispflanzen auf das Vorkommen von Dehydrogenasen der Glycolyse (Genaueres siehe S. 338). Gewebe, die gemäss Gradwohl höchste Dehydrogenasenaktivität aufweisen, sind in meinen Versuchen die Orte stärksten Aufbaus wasserunlöslicher Aktivität. Diese Parallelität erstreckt sich bis auf Einzelheiten: Die stärksten Tetrazoliumreduktoren sind die sich differenzierende Epidermis und das reifende Metaxylem. Das Sklerenchym zeigt ebenfalls Dehydrogenasenaktivität, solange es nicht fertig ausgebildet ist. Das Vorhandensein wasserunlöslicher Aktivität ist offensichtlich ein Indikator für intensive Atmung und grossen Stoffumsatz. Das Phloem zeigt eine andere Gesetzmässigkeit im Aufbau wasserunlöslicher Aktivität: Es besteht ein mehr oder weniger deutlicher Aktivitätsabfall von der Fütterungsstelle weg. Turkina (1959) konnte zeigen, dass ein Teil der Transportsaccharose im Phloem glycolytisch abgebaut wird und über die organischen Säuren des Krebszyklus zum Aufbau von Aminosäuren beiträgt. Von der Aminosäure ist es dann ein kleiner Schritt zum Einbau in Proteine. Canny (1960) fand, dass je Stunde rund 1% der transportierten Saccharose in den Leitgeweben veratmet wird. Bei der hohen Atmungsrate der Leitbündel (Kursanov, 1963) und der vergleichsweise höheren Konzentration markierter Zucker gegenüber dem Parenchym ist es gut erklärlich, warum das reife Phloem im Gegensatz zu andern ausgewachsenen Geweben in nachweisbarem Mass wasserunlösliche Aktivität aufbaut. Von der Fütterungsstelle weg wird die Aktivität zunehmend verdünnt, der Aufbau wasserunlöslicher Aktivität dadurch verzögert, was zur Bildung des erwähnten Gradienten führt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Verteilung der wasserunlöslichen Aktivität es erlaubt, das Sklerenchym als Transportgewebe auszuschliessen. Aufwärts- und Abwärtstransport gehen allein im Phloem vor sich.

5. Die Rolle der Geleitzellen

Sieb- und Geleitzellen weisen die gleiche Schwärzungsintensität auf, ungeachtet ob es sich um die Totalaktivität oder die wasserunlösliche Aktivität handelt. Einzig die Siebplatten enthalten in den langzeitigen Versuchen bedeutend mehr wasserunlösliche Aktivität als die Geleitzellen und das übrige Siebröhrenplasma (Abb. 9).

Bei der Differenzierung des Phloems werden von einer Mutterzelle aus je eine Siebzelle und 1–2 Geleitzellen gebildet. Während die Siebzelle im Verlaufe der Reifung ihren Kern verliert, sich vakuolisiert und zum Schluss nur noch mit einem dünnen, plasmolysierbaren Plasmawandbelag ausgekleidet ist (Schumacher, 1939; Rouschal, 1941; Currier, 1955), bleibt die Geleitzelle dicht mit Plasma ausgefüllt und bewahrt auch einen funktionsfähigen Kern. Resch (1954) schrieb: «Geleit- und Siebzellen bilden eine cytologische und wohl auch physiologische Einheit. Ein äusseres Zeichen dieser Einheit ist die enge Verbindung beider Zellen durch viele Tüpfel bzw. Plasmodesmata und die hohe Hydratation der gemeinsamen, aber nicht trennenden Cellulose-Längswand.»

Kollmann (1960) wies in ausgereiftem Siebröhrenplasma Mitochondrien und Plastiden nach, was eine Siebröhrenatmung grundsätzlich möglich erscheinen lässt. Bauer (1953) und Currier (1955) konnten keine Formazanbildung in reifen Siebröhren nachweisen. Wanner (1952) und Frey (1954) fanden speziell hohe Phosphataseaktivität in Geleitzellen, aber auch in Siebröhren. Van Fleet (1952) entdeckte in allen Phloemzellen hohe Peroxydaseaktivität. Gradwohl (1965) untersuchte die Verbreitung verschiedener für den glycolytischen Abbau spezifischer Dehydrogenasen in Gefrierschnitten von Mais- und Kürbisgeweben. Nach dem Entfernen der endogenen Substrate wurden die Gefrierschnitte in spezifische Substratlösungen (Äpfelsäure, Citrat, Glucose-6-Phosphat, Glycerinaldehyd) zusammen mit Tetrazoliumsalzen inkubiert und aus der Formazanbildung auf die Aktivität der entsprechenden Dehydrogenasen geschlossen. Es gelang Gradwohl, in Geleitzellen wie ausgereiften Siebzellen funktionsfähige Dehydrogenasen nachzuweisen. Damit dürfte der schlüssige Nachweis erbracht sein, dass die Siebzellen den Enzymapparat für einen eigenständigen Energiehaushalt besitzen.

Sieb- und Geleitzellen bilden offensichtlich eine physiologische Einheit. Alle Voraussetzungen sind vorhanden, dass die transportierten Assimilate leicht von den Siebzellen in die Geleitzellen übertreten können und

umgekehrt. Wird noch die relative Unempfindlichkeit der trockenen Nachweismethode berücksichtigt, überrascht die Tatsache nicht, dass zwischen den zwei Zellarten *kein Aktivitätsunterschied* festzustellen ist. Die schon früher erwähnte auffällige Parallelität zwischen dem Aufbau wasserunlöslicher radioaktiver Substanzen und der Dehydrogenasenaktivität wirft ein interessantes Licht auf die starken Siebplattenschwärzungen bei der nassen Nachweismethode: Falls diese Parallelität nicht zufällig ist, würden meine Ergebnisse diejenigen von Hepton (1960) bestätigen, der eine hohe metabolische Aktivität der Siebporen-Protoplasmastränge feststellte. Zugleich würde die Theorie Spanners (1958) gestützt, welche dem Siebplattenplasma eine entscheidende energetische Rolle im Transport zuweist.

6. *Richtung des Transportes*

Nach 30 min Fütterung enthalten alle Blätter Aktivität, die Koleoptile ausgenommen. Es bestehen jedoch bedeutende Verteilungsunterschiede: In den ausgewachsenen Blattscheiden beschränkt sich die Schwärzung auch nach 5 h fast ausschliesslich auf die Leitbündel. In den jungen Blättern ist die Aktivität nach 30 min weniger deutlich vorhanden, jedoch schon auf alle Gewebe verteilt und steigt überall sukzessiv mit Verlängerung der Fütterungszeit. Offenbar werden die Assimilate in junge wie alte Blätter gleich rasch herangeführt, verlassen aber in ausgewachsenen Blättern die Leitgewebe nur zögernd. Dieses Ergebnis stimmt sehr schön mit den Befunden von Mothes (1961) überein, der für junge Gewebe ein höheres Retentions- und Akkumulationsvermögen postuliert, das dann sekundär den Nachstrom neuer Baustoffe induziert.

7. *Aufwärts- und Abwärtstransport in der Blattscheide*

Ungeachtet ob es sich um das Fütterungsblatt oder ein anderes Blatt handelt, beschränkt sich in den Kurzzeitversuchen die Schwärzung in den Blattscheiden auf Phloem und Sklerenchym. Die lateralen Bündel sind kräftig, die intermediären Bündel schwächer markiert. Die einzelnen Siebteile sind in allen Zellen gleich stark aktiv. Da das Sklerenchym als Transportgewebe ausgeschlossen werden muss, erlaubt das Ergebnis den Schluss, dass das gleiche Siebgewebe für den Aufwärtstransport (= Eintransport der Assimilate) wie für den Abwärtstransport (= Export der Assimilate) benützt wird. Es gibt bei Maisblättern keine Spezialisierung der Bündel auf eine bestimmte Transportrichtung, was nicht ausschliesst, dass innerhalb eines Siebteiles die einzelnen Siebzellstränge richtungsspezifisch transportieren. Bei der Kleinheit der einzelnen Phloemflächen ist es denkbar, dass die Assimilate auch zwischen Strängen mit gegenläufigem Transport rasch ausgetauscht werden, vor allem wenn

man die Möglichkeit berücksichtigt, dass solche Kanäle alternierend angeordnet sein könnten. Allerdings erklärt die Annahme eines gegenläufigen Transportes in der gleichen Siebzelle das Ergebnis mindestens ebenso gut. Ob sich dieses Problem mit Hilfe der Mikroautoradiographie lösen lässt (noch kürzere Versuchszeiten, höhere spezifische Aktivitäten der Transportsubstanzen), scheint mir fraglich.

8. Transportgeschwindigkeit

Aus früher erwähnten Gründen kann es sich bei meiner Angabe nur um eine Minimalgeschwindigkeit handeln, vor allem auch, weil nicht einmal im 30-min-Versuch eine eigentliche Front erfasst wurde.

Phloem und Sklerenchym waren 30 cm von der Fütterungsstelle weg nach 30 min schon deutlich markiert. Dies entspricht einer Minimalgeschwindigkeit von 60 cm/h.

V. Zusammenfassung

1. Zwei Wochen alte Maispflanzen wurden über die Blattspitzen verschieden alter Blätter 30 min–10 h mit THO gefüttert. Gewebeproben wurden gefriersubstituiert oder gefriergetrocknet, in Esterwachs eingebettet, 5–10 μ dick geschnitten und nach dem nassen bzw. trockenen Stripping-Film-Verfahren autoradiographiert. Das trockene (Branton-)Verfahren musste dahin abgeändert werden, dass das Einbettungsmittel vor der Exposition entfernt wurde, weil sonst die Ausbeuteverluste zu hoch und das Auflösungsvermögen zu gering waren.
2. Die Erhaltung wasserlöslicher aktiver Verbindungen war bei der Gefriersubstitution gleich gut, die Schneidbarkeit der Gewebe jedoch bedeutend besser als bei der Gefriertrocknung.

Nasse Autoradiographie führte zu einem totalen Verlust aller abbildbaren wasserlöslichen T-Aktivität, 3 h Extraktion in 80% Alkohol mit anschließender FAA-Fixierung zu fast vollständigem Verlust.

Es wird die Eignung der Mikroautoradiographie für Transportuntersuchungen diskutiert, ebenso werden die Schwierigkeiten besprochen, welche zusätzlich auftreten, wenn anstelle von $C^{14}O_2$ als Tracer THO verwendet wird.

3. In den Kurzzeitversuchen waren gegen die Front zu allein Phloem und Sklerenchym markiert. Die Verteilung der wasserunlöslichen Aktivität ermöglicht, das Sklerenchym als Transportgewebe auszuschliessen. Die Bedeutung der wasserunlöslich eingebauten Aktivität als Indikator für wachsende Gewebe und hohen Energieumsatz wurde gezeigt.

Es wird auf die Parallelität zwischen dem Vorkommen wasserunlöslicher Aktivität und Dehydrogenasen der Glycolyse hingewiesen.

4. Blätter, die älter als das Fütterungsblatt waren, bauten die markierten Assimilate nicht in wasserunlösliche Verbindungen um. Der Assimilateintransport erfolgte in junge und alte Blätter gleich rasch, die Assimilate verliessen jedoch bei ausgewachsenen Blättern die Leitgewebe nur langsam.
5. Beim Aufwärts- und Abwärtstransport in der Blattscheide waren die gleichen Siebteile markiert. Dieses Ergebnis spricht für gleichzeitigen Transport in entgegengesetzter Richtung im gleichen Siebteil und macht wahrscheinlicher, dass auch die Siebzellstränge gegenläufigen Transport aufweisen.
6. Es wurde für den Assimilattransport eine Minimalgeschwindigkeit von 60 cm/h gefunden.

Die vorliegende Arbeit entstand unter Leitung von Prof. Dr. H. Wanner am Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich. Ich danke Prof. Dr. H. Wanner für die Überlassung des interessanten Themas und für seine wertvollen Ratschläge.

Ebenso bin ich Prof. Dr. R. Bachofen und Herrn K. Schneider für klärende Diskussionen zu Dank verpflichtet. Der Präparator, Herr E. Schütz, half mir beim Photographieren. Ihm sei an dieser Stelle ebenfalls gedankt.

Die Schweizer Kommission für Atomwissenschaft stellte in verdankenswerter Weise das THO zur Verfügung.

Summary

1. Various leaves of corn seedlings (two weeks old) were supplied with tritiated water from 30 min to 10 h with leaf tips dipping into radioactive water. Tissue samples were freeze-substituted or freeze-dried, embedded in ester wax and cut to sections of 5 to 10 μ . The autoradiographs were prepared according to the stripping-film method and the dry tissue procedure (Branton). When using the dry tissue procedure, better resolution and recovery was obtained by removing the ester wax before exposing the film.
2. Recovery of water-soluble radioactive compounds was as good with freeze-substitution as with freeze-drying but freeze-substituted samples gave better sections. With the stripping-film method complete loss of water-soluble tritium activity was observed, similar to 3 h extraction in 80% ethanol followed by fixation in FAA.
3. In short time experiments only the phloem and the sclerenchym were labelled at the front of activity. Sclerenchym can be shown not to be a

channel of translocation by the distribution pattern of water-insoluble activity. Accumulation of water-insoluble activity indicates growing tissues and active metabolism and agrees with the histochemical localization of glycolytic dehydrogenases.

4. No water-insoluble activity could be detected in leaves older than the fed leaf. Labelled assimilates reached young and old leaves at the same time but they left the bundles of adult leaves very slowly.
5. In the leaf sheath translocation upwards and downwards shows the same labelling pattern in the phloem of bundles. This indicates a simultaneous translocation in opposite directions in the same parts of the phloem and perhaps even in the same sieve-tube.
6. The minimum velocity for translocation of assimilates was found to be 60 cm/h.

Literaturverzeichnis

- Aronoff S. 1958. Use of Radioisotopes in Selected Aspects of Plant Physiology and of Radiation in Plant Breeding. Part 8, 633-658. Addison-Wesley Publ. Comp., Reading, Massachusetts.
- Bauer L. 1949. Über den Wanderungsweg fluoreszierender Farbstoffe in den Siebröhren. *Planta* **37**, 221-243.
- 1953. Zur Frage der Stoffbewegung in der Pflanze mit besonderer Berücksichtigung von Fluorochromen. *Planta* **42**, 367-451.
- Biddulph S.F. 1956. Visual Indication of S-35 und P-32 Translocation in the Phloem. *Amer. J. Bot.* **43**, 143-148.
- Biddulph O. und R. Cory. 1957. An Analysis of Translocation in the Phloem of the Bean Plant Using THO, P-32 and C-14. *Plant Phys.* **32**, 608-619.
- 1960. Demonstration of Two Translocation Mechanisms in Studies of Bidirectional Movement. *Plant Phys.* **35**, 689-695.
- Branton D. und L. Jacobson. 1962. Dry, High-Resolution Autoradiography. *Stain Techn.* **37**, 239-242.
- Boyd G.A. 1955. *Autoradiography in Biology and Medicine*. Academic Press Inc., New York.
- Canny M.J. 1955. High-Resolution Autoradiography of Water-Soluble Substances. *Nature* **175**, 857-858.
- 1960. Sucrose Breakdown During Translocation. *Ann. Bot.* **24**, 330-344.
- Chen S.L. 1951. Simultaneous Movement of P-32 and C-14 in Opposite Directions in Phloem Tissue. *Amer. J. Bot.* **38**, 203-211.
- Clor M. A., A. S. Crafts und S. Yamaguchi. 1962. Effects of High Humidity on Translocation of Foliar-Applied Labelled Compounds in Plants I. *Plant Phys.* **37**, 609-617.
- Colwell R.N. 1942. The Use of Radioactive Phosphorus in Translocation Studies. *Amer. J. Bot.* **29**, 798-807.
- Crafts A.S. 1961. *Translocation in Plants*. Holt, Rinehart and Winston, New York.
- Currier H.B., K. Esau und V.I. Cheadle. 1955. Plasmolytic Studies of Phloem. *Amer. J. Bot.* **42**, 68-81.
- Esau K. 1943. Ontogeny of the Vascular Bundle in *Zea Mays*. *Hilgardia* **15**, 327-368.
- H.B. Currier und V.I. Cheadle. 1957. *Physiology of Phloem*. *Ann. Rev. Plant Phys.* **8**, 349-374.
- Eschrich W. 1953. Beiträge zur Kenntnis der Wundsiebröhrenentwicklung bei *Impatiens holsti*. *Planta* **43**, 37-74.
- Frey G. 1954. Aktivität und Lokalisation von sauren Phosphatasen in den vegetativen Teilen einiger Angiospermen und in einigen Samen. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* **64**, 390-452.
- Gage R.S. und S. Aronoff. 1960. Radioautography of Tritiated Photosynthate Arising from THO. *Plant Phys.* **35**, 65-68.
- Gessner F. 1956. Wasseraufnahme durch Blätter und Samen. *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. III, 215-222. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Glick D. und B.G. Malmstrom. 1952. Simple and Efficient Freeze-Drying Apparatus for the Preparation of Embedded Tissue. *Exp. Cell Res.* **3**, 125-135.
- Gradwohl P. 1965. Cyto- und histochemische Lokalisation verschiedener Dehydrogenasen in den Vegetations- und Fortpflanzungsorganen einer monocotylen und einer dicotylen Pflanze. Diss. Institut für Allg. Bot. Universität Zürich. Noch unveröffentlicht.

- Haines F.M. 1953. The Absorption of Water by Leaves in Fogged Air. *J. exp. Bot.* **4**, 106–107.
- 1952. The Absorption of Water by Leaves in an Atmosphere of High Humidity. *J. exp. Bot.* **3**, 95–98.
- Hancox N.M. 1957. Experiments on the Fundamental Effects of Freeze-Substitution. *Exp. Cell Res.* **13**, 1957.
- Hayward H.E. 1938. The Structure of Economic Plants. Chap. V and VI, 111–178. MacMillan Comp., New York.
- Hepton C.E.L. und R.D.Preston. 1960. Electron Microscopic Observations of the Structure of Sieve-Connexions in the Phloem of Angiosperms and Gymnosperms. *J. exp. Bot.* **11**, 381–393.
- Hill R. und C.P.Whittingham. 1961. Photosynthesis. Chap. 2. Plant Structure in Relation to Photosynthesis. 6–15. Methuen & Co., London.
- Jensen W.A. 1962. Botanical histochemistry. Freeman and Comp., San Francisco and London.
- Kisieleski W.E., R.Baserga und J.Vaupotic. 1961. *J. Radiation Res.* **15**, 341, nach Maurer (1964) zitiert.
- Kollmann R. 1960. Untersuchungen über das Protoplasma der Siebröhren von *Passiflora Coerulea*. *Planta* **55**, 67–107.
- Kursanov A.L. 1963. Metabolism and the Transport of Organic Substances in the Phloem. *Advances in Botanical Research* **1**, 209–278. Academic Press, London and New York.
- Loomis W.E. 1945. Translocation of Carbohydrates in Maize. *Science* **101**, 398–400.
- Mason T.G., E.J.Maskell und E.Phillis. 1936. Further Studies on Transport in Cotton Plant. *Ann. Bot.* **50**, 23–58.
- Maurer W. und E.Primbsch. 1964. Grösse der β -Selbstabsorption bei der H-3-Autoradiographie. *Exp. Cell Res.* **33**, 8–18.
- Miller O.L., G.E.Stone und D.M.Prescott. 1964. Autoradiography of Soluble Materials. *J. exp. Cell Biol.* **23**, 654–658.
- Moses V. und M.Calvin. 1959. Photosynthesis Studies with Tritiated Water. *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 297–312.
- Mothes K. 1961. Aktiver Transport als regulatives Prinzip. *Biochemie des aktiven Transports*. 189–204. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Ordin L. und J.Bonner. 1956. Permeability of *Avena* Coleoptile Sections to Water Measured by Diffusion of Deuterium Hydroxide. *Plant Phys.* **31**, 53–57.
- Palmquist E.M. 1938. The Simultaneous Movement of Carbohydrates and Fluorescein in Opposite Directions in the Phloem. *Amer. J. Bot.* **25**, 97–105.
- Pelc S.R. 1947. Autoradiograph Technique. *Nature* **160**, 749–750.
- Perkins H.J., C.D.Nelson und P.R.Gorham. 1959. A Tissue-Autoradiographic Study of the Translocation of C-14-Labelled Sugars in the Stem of Young Soybean Plants. *Can. J. Bot.* **37**, 871–877.
- Philip J.R. 1958. Osmosis and Diffusion in Tissue: Half-times and Internal Gradients. *Plant Phys.* **33**, 275–278.
- Resch A. 1954. Beiträge zur Cytologie des Phloems. *Planta* **44**, 75–98.
- Robertson J.S., V.P.Bond und E.P.Cronkite. 1959. Resolution and Image Spread in Autoradiographs of Tritium-Labelled Cells. *Intern. J. Appl. Rad. Isotopes* **7**, 33–37.

- Rouschal E. 1941. Untersuchungen über die Protoplasmatik und Funktion der Siebröhren. *Flora* **135**, 135–200.
- Russell R.S., F.K.Sanders und O.Bishop. 1949. Preparation to Show the Distribution of P-32 in Plant Tissue. *Nature* **163**, 639.
- Schumacher W. 1930. Untersuchungen über die Lokalisation der Stoffwanderung in den Leitbündeln höherer Pflanzen. *Jb. wiss. Bot.* **73**, 770–823.
- 1932. Untersuchungen über die Wanderung des Fluoreszeins in den Siebröhren. *Jb. wiss. Bot.* **77**, 685–732.
- 1937. Weitere Untersuchungen über die Wanderung von Farbstoffen in den Siebröhren. *Jb. wiss. Bot.* **85**, 422–449.
- 1939. Über die Plasmolysierbarkeit der Siebröhren. *Jb. wiss. Bot.* **88**, 545–553.
- Sharman B.C. 1942. Developmental Anatomy of the Shoot of *Zea Mays*. *Ann. Bot. N.S.* **6**, 245–282.
- Simon H. und A.Trebst. 1961. Über den Einbau von Tritium in einige Zucker bei der Photosynthese. *Z. Naturforschg.* **16b**, 285–287.
- und H.Dorrer. 1964. Photosyntheseversuche in Tritiumwasser mit *Chlorella*. *Z. Naturforschg.* **19b**, 734–744.
- Slatyer R.O. 1956. Absorption of Water from Atmosphere of Different Humidity and its Transport through Plants. *Aust. J. Biol. Sci.* **9**, 552–558.
- 1960. Absorption of Water by Plants. *Bot. Rev.* **26**, 331–392.
- Steubing L. 1949. Beitrag zur Tauwasseraufnahme höherer Pflanzen. *Biol. Zentralblatt* **68**, 252–259.
- Thaine R. 1961. Transcellular Strands and Particle Movement in Mature Sieve Tubes. *Nature* **192**, 772–773.
- Turkina M.V. 1959. The Transformation of Sucrose in the Fibrovascular Bundles of Sugar Beet. *Fiziol. Rastanii* **6**, 709–718.
- Vaadia Y. und Y.Waisel. 1963. Water Absorption by the Aerial Organs of Plants. *Phys. plantarum* **16**, 44–51.
- Van Fleet D.S. 1952. Histochemical Localization of Enzymes in Vascular Plants. *Bot. Rev.* **18**, 354–398.
- Vartapetyan B.B. und A.L.Kursanov. 1961. Water Exchange Between Plant Tissues and Liquid Water and Vapor in the Environment. *Fiziol. Rastanii* **8**, 569–575.
- Wanner H. und G.Frey. 1952. Phosphataseverteilung und Kohlenhydrattransport in der Pflanze. *Planta* **41**, 190–194.
- Wetzel K. 1924. Die Wasseraufnahme der höheren Pflanzen gemässiger Klimate durch oberirdische Organe. *Flora* **117**, 221–269.
- Winteringham F.P.W., A.Harrison und J.H.Hammond. 1950. Autoradiography of Water-Soluble Tracers in Histological Sections. *Nature* **165**, 149–150.
- Zimmermann M.H. 1960. Transport in the Phloem. *Ann. Rev. Plant Phys.* **11**, 167–190.