

PROTEINBIOSYNTHESEN IN DORMANTEN UND NACHGEREIFTEN EMBRYONEN UND SAMEN VON *AGROSTEMMA GITHAGO*

MICHAEL HECKER und DIETER BERNHARDT

Sektion Biologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität DDR-22 Greifswald, Grimmer Str. 88

(Revised received 12 February 1976)

Key Word Index—*Agrostemma githago*; Caryophyllaceae; seed germination; seed dormancy; protein biosynthesis; RNA biosynthesis; Poly(A)-RNA.

Abstract—Seed germination of *Agrostemma githago* is prevented by inhibitors of protein and RNA synthesis. Thus protein as well as RNA synthesis are essential prerequisites for germination. Early protein synthesis of *Agrostemma* embryos can be completely inhibited by cycloheximide and cordycepin. During the aging of seeds there is a considerable decrease in germination capacity and protein synthesis. In dormant and afterripened embryos of *Agrostemma githago* ^{14}C -leucine and ^{14}C -uracil are incorporated in protein and RNA respectively with nearly the same intensity, whereas RNA and protein synthesis of dormant seeds and embryos starts earlier than in those subjected to afterripening. ^3H -uracil-labelled RNA from dormant and afterripened embryos are able to hybridize on oligo-dT-cellulose to the same extent. There is a similarity in the protein pattern of dormant and afterripened embryos revealed by electrophoresis in polyacrylamide gels of double-labelled proteins. According to these results dormancy of *Agrostemma githago* is not caused by a general but by a specific metabolic block.

EINLEITUNG

Entwicklungsbiologische Prozesse werden nach modernen Konzeptionen durch differentielle Genexpression gesteuert, wobei unter differentieller Genexpression neben der Regulation auf Transcriptionsebene auch die im Bereich der Posttranscription, der Translation oder der Posttranslation zu verstehen ist. Blockierte und aktivierte pflanzliche Samen stellen dabei geeignete Objekte dar, an denen molekularbiologische Interpretationen von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen geprüft werden können. Die Annahme, daß die Dormanz pflanzlicher Verbreitungseinheiten generell durch eine Repression des Genoms und damit durch eine erheblich verminderte RNA-Synthese verursacht wird [1,2], ist nach neueren Untersuchungen, die mit Samen durchgeführt wurden, nicht zu verallgemeinern. Obwohl bei stratifikationsbedürftigen Samen eine positive Korrelation zwischen der Höhe der RNA-Synthese (und z. T. der Proteinsynthese) und der physiologischen Aktivität der Samen beschrieben wurde [3-7], sind dormante Karyopsen von *Avena fatua* [8], dormante Embryonen von *Lactuca sativa* [9,10] oder von *Agrostemma githago* [11,12] weder durch eine verminderte RNA- noch Proteinsyntheserate zu charakterisieren. Nach diesen Befunden müßte die Expression nur weniger Gene am keimungsauslösenden Mechanismus beteiligt sein. Durch eine Analyse der Regulation der Proteinbiosynthese in dormanten und nachgereiften Embryonen von *A. githago* sollen diese Vorstellungen verifiziert werden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

RNA- und Proteinbiosynthesen in quellenden Embryonen. In dormanten Embryonen von *A. githago* setzen RNA- und Proteinbiosynthesen unmittelbar nach

Quellungsbeginn ein, so daß die enzymatischen und strukturellen Voraussetzungen für die Aufnahme dieser Makromolekülsynthesen schon in trockenen Embryonen vorhanden sein müssen (Abb. 1, 2, vgl. [13]). Dagegen ist in quellenden Embryonen des Roggens [14], der Bohne [15] oder der Erbse [16] die Proteinbiosynthese deutlich vor der RNA-Synthese nachzuweisen. In nachgereiften, d. h. physiologisch aktiven *Agrostemma*-Embryonen erfolgt der Uracil- bzw. Aminosäuren-Einbau verzögert (Abb. 1, 2, vgl. [11,12]). Gealterte

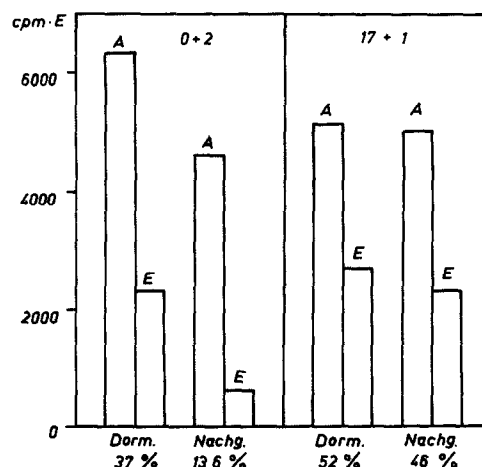


Abb. 1. ^{14}C -Leucin-Einbau durch dormante und nachgereifte *Agrostemma*-Embryonen während der frühen (0 + 2) und späten (17 + 1) Quellungsstadien (Ernte 1970, Versuchsdurchführung 1971). In Form von Säulen sind die Aufnahme (A)- und Einbau (E)-Raten dargestellt, der dazugehörige prozentuale Einbau bezogen auf die Aufnahme ist unterhalb der Abbildung angegeben.

Tabelle 1. Proteinbiosynthese und Keimung gealterter Samen von *Agrostemma githago*

Jahrgang	^{14}C -Leucin-Einbau 6 + 1	% Keimung nach 40 hr
1970	2150	86%
1968	1168	72%
1966	236	20%

Zur Bestimmung der Proteinbiosynthese wurden die Embryonen nach 6 h Quellung isoliert und in $3 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -DL-Leucin-(1) (spez. Akt. 25 mCi/mmol) inkubiert. Die Einbauraten wurden in Impulsen pro Minute und Embryo angegeben (alle drei Varianten zeigten ähnliche ^{14}C -Leucin-Aufnahmeraten). Die Experimente wurden im Herbst 1971 durchgeführt.

Embryonen von *A. githago* bauen in den ersten Quellungsstunden praktisch keine Aminosäuren in Proteine ein (Tab. 1), der verzögerte Start der Proteinsynthese dürfte mit der verminderten Keimungsgeschwindigkeit dieser Samen in Zusammenhang stehen [17].

Die frühe Proteinsynthese quellender *Agrostemma*-Embryonen kann durch Cycloheximid und Cordycepin vollständig unterbunden werden (Tab. 2). Diese Befunde veranlassen uns anzunehmen, daß die frühe Proteinsynthese ausschließlich an cytoplasmatischen 80 S-Ribosomen abläuft und von einer Poly(A)-mRNA-Synthese bzw. einer Polyadenylation stabiler mRNA [18] abhängig ist, wenn man von möglichen Nebenwirkungen des Cordycepins absieht. Auf diese Problematik soll an anderer Stelle ausführlich eingegangen werden.

In späteren Quellungsstunden bauen Embryonen aus dormanten und nachgereiften *Agrostemma*-Samen markiertes Leucin und Uracil mit annähernd gleicher Intensität in Protein bzw. RNA ein (Abb. 1, 2).

Die erhaltenen Einbauraten können durch einige Störgrößen beeinträchtigt werden; insbesondere ist hierbei an sich verändernde Poolgrößen und an eine Kontamination durch Bakterien zu denken. Da prinzipiell ähnliche Ergebnisse nach einer "Verdünnung" der angebotenen radioaktiven Vorstufen mit nicht markierten Verbindungen (L-Leucin bzw. Uracil) erhalten wurden (Erniedrigung der spezifischen Radioaktivität bei stark ansteigender Konzentration der applizierten Vorstufen), sind größere Unterschiede im Aminosäuren- und Uracil-Pool dormanter und nachgereifter Samen und Embryonen im Untersuchungszeitraum nicht anzunehmen. Erst nach erfolgtem Radiculadurchbruch kommt es –wahrscheinlich infolge der einsetzenden Hydrolyse von Reserveproteinen [20]–zu einer Überschwemmung des Pools mit freien Aminosäuren [21], so daß die erhaltenen Einbauraten eine zu geringe

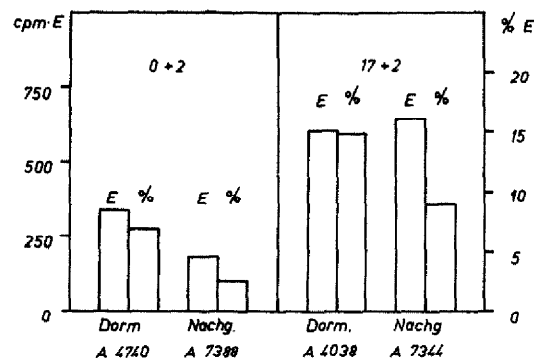


Abb. 2. ^{14}C -Uracil-Einbau durch dormante und nachgereifte *Agrostemma*-Embryonen während der frühen (0 + 2) und späten (17 + 2) Quellungsstadien (Ernte 1973). In Form von Säulen sind der absolute (E) und prozentuale (%) Einbau dargestellt, die dazugehörigen Leucin-Aufnahme-Raten sind unterhalb der Abbildung angegeben (A).

Syntheseintensität vortäuschen [11]. Diese Stadien wurden jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Durch den Einsatz von Antibiotika (Chloramphenicol, Streptomycin, Oxytetracyclin, Ampicillin sowie vergleichsweise Cycloheximid als Hemmstoff der cytoplasmatischen Proteinsynthese) konnte eine Beteiligung von Bakterien am Uracil- und Leucin-Einbau durch isolierte *Agrostemma*-Embryonen ausgeschlossen werden.

BEDEUTUNG DER RNA- UND PROTEINSYNTHESEN FÜR DIE KEIMUNG

Eine nach Applikation von spezifischen Inhibitoren verminderte RNA- und Proteinbiosynthese bewirkt in jedem Fall eine Hemmung der Samenkeimung von *Agrostemma*, woraus eine direkte Abhängigkeit der Samenkeimung von bestimmten Protein- und RNA-Synthesen sichtbar wird (Abb. 3). Ähnliche Befunde wurden auch von anderen Autoren erhalten [21–25]. Dagegen sollen die für die Keimung der Baumwollsaamen essentiellen Proteine an langlebiger mRNA gebildet werden, da Inhibitoren der RNA-Synthese die Keimung nicht hemmen ([26], vgl. auch [27]).

Actinomycin D vermindert in hohen Konzentrationen weder die Keimung noch die RNA-Synthese von *Agrostemma*-Samen; wahrscheinlich gelangt der Inhibitor nicht an die Orte der RNA-Synthese, oder er wird überhaupt nicht aufgenommen (Abb. 3). Versuche über den

Tabelle 2. Einfluß von Cordycepin (5 mM) und von Cycloheximid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auf die frühe Proteinbiosynthese nachgereifter *Agrostemma githago*-Embryonen (1974)

	Aufnahme	Einbau	% Einbau	% Inhibition des Einbaus
Kontrolle	10404	1232	11,8	0
Cordycepin	9904	272	2,8	76%
Cycloheximid	10134	124	1,2	90%

5 Embryonen wurden aus trockenen *Agrostemma*-Samen isoliert und 3 h in $1 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -L-Leucin-(u) (spez. Akt. 185 mCi/mmol, Volumen 0,5 ml) bei 20°C inkubiert. Die Leucin-Aufnahme- bzw. Einbau-Rate wurde in Impulsen pro Minute und Embryo oder in % Einbau bezogen auf die Gesamtaufnahme angegeben.

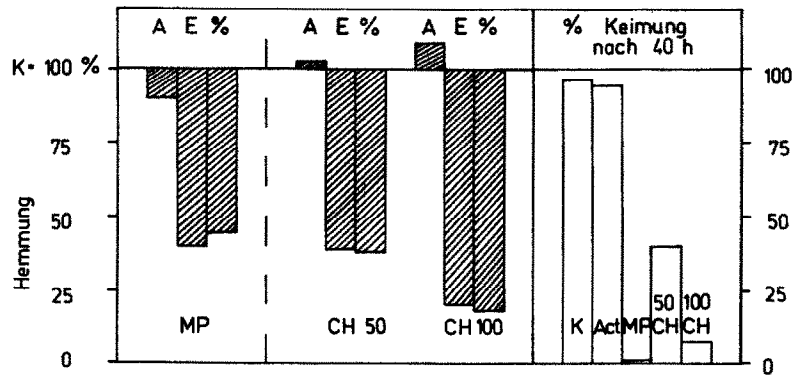


Abb. 3. Einfluß von 6-Methylpurin (MP, 200 µg/ml) auf den ^3H -Uracil-Einbau und von Cycloheximid (CH, 50 und 100 µg/ml) auf den ^{14}C -L-Leucin-Einbau durch nachgereifte *Agrostemma githago*-Embryonen (Ernte 1973). Vergleichsweise wurden die Keimprozent nach 40 Quellungsstunden unter dem Einfluß der Inhibitoren ermittelt. Die Wirkung der Inhibitoren auf die Precursor-Aufnahme (A), auf den Einbau (E) und auf den prozentualen Einbau (%) wurden in % der Kontrolle (Kontrolle gleich 100%) angegeben. Die relativ hohen Wirkstoffkonzentrationen waren erforderlich, da die Samenschale die Inhibitorenaufnahme stark beeinträchtigt (vgl. Tab. 2). Zur Bestimmung der RNA- und Proteinbiosynthese wurden die *Agrostemma*-Samen 18 h dunkel bei 20° angequollen und die isolierten Embryonen 2 hr in 10 µCi ^3H -Uracil-(5) (spez. Akt. 27,3 Ci/mmol) bzw. 1 hr in 1 µCi ^{14}C -L-Leucin-(u) (spez. Akt. 185 mCi/mmol) inkubiert. Actinomycin D (Act) übt in einer Konzentration von 100 µg/ml weder auf die Keimung noch auf die RNA-Synthese einen meßbaren Einfluß aus.

Einfluß von spezifischen Inhibitoren auf die Samenkeimung ohne gleichzeitige Bestimmung der Makromolekülsynthesen müssen daher mit Vorsicht interpretiert werden.

Intensität transkribiert werden [12] (Der Anteil der Poly(A)⁻-mRNA [29, 30] bleibt bei diesen Vorstellungen unberücksichtigt).

POLY(A)-mRNA-SYNTHESEN IN DORMANTEN UND NACHGEREIFTEN EMBRYONEN

Während der Quellung von *A. githago*-Samen findet eine intensive mRNA-Synthese statt; die frühen Proteinbiosynthesen quellender Embryonen werden sowohl durch neu synthetisierte als auch durch stabile, in trockenen Samen vorhandene mRNA gesteuert ([19], vgl. aber [27]).

In den letzten Jahren ist der Nachweis von Poly(A)-Sequenzen an pflanzlicher mRNA gelungen [28]. Durch Affinitätschromatographie von radioaktiv markierter RNA an Oligo-dT-Cellulose oder Poly(U)-Sephrose können die Poly(A)-haltigen mRNA relativ rein gewonnen werden [29]. Mit Hilfe der Hybridisierung ^3H -Uracil- und ^{14}C -Adenin-markierter RNA an Oligo-dT-Cellulose konnten wir aus quellenden *Agrostemma*-Embryonen mRNA isolieren, deren Poly(A)-Sequenzen durch Behandlung mit pankreatischer RNase und anschließender Basenanalyse nachgewiesen wurden. Etwa 30% der ^{14}C -Adenin-Markierung erwiesen sich als RNase-stabil, dagegen wurde die ^3H -Uracil-markierte RNA vollständig abgebaut [19]. Die Charakterisierung der Poly(A)-Sequenzen erfolgt an anderer Stelle.

^3H -Uracil-markierte RNA aus quellenden dormanten und nachgereiften Embryonen von *A. githago* vermag unter vergleichbaren Bedingungen an Oligo-dT-Cellulose zu gleichen Anteilen zu hybridisieren; nach Vorbehandlung der Oligo-dT-Cellulose mit Poly(A) erfolgt keine Hybridisierung (Abb. 4). Diese Befunde bekräftigen unsere Vorstellung, daß in dormanten, d. h. entwicklungsblockierten Embryonen nicht nur rRNA- und tRNA, sondern auch mRNA bzw. HnRNA mit unverminderter

TRENNUNG DER RADIOAKTIV MARKIERTEN PROTEINE DURCH POLYACRYLAMID-DISK-ELEKTROPHORESE

Nach unseren Ergebnissen dürfte die Ursache der Entwicklungshemmung dormanter Embryonen und Samen nicht in einer generell verminderten Protein- und RNA-Synthese zu suchen sein. Es gilt jedoch als gesichert, daß die Synthese einiger "keimungsessentieller

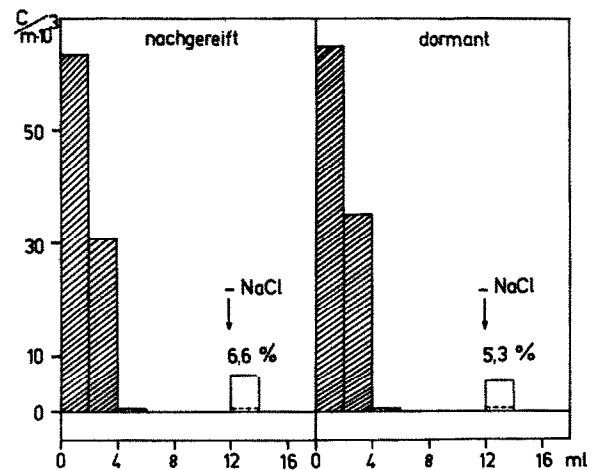


Abb. 4. Hybridisierung von ^3H -Uracil-markierter RNA aus quellenden dormanten und nachgereiften *Agrostemma githago*-Embryonen an Oligo-dT-Cellulose. Die Hybridisierungsrate wurde in % bezogen auf die Gesamt-RNA angegeben. Wurde die Säule vor dem Experiment mit 100 µg Poly(A) versetzt, erfolgte keine Hybridisierung (gestrichelte Linie).

Proteine" in der Quellungsphase ablaufen muß, um die Radicula zum Durchbruch der Testa anzuregen (vgl. Abb. 3). Akzeptiert man die Vorstellungen von der Regulation des Aktivitätswechsels auf Genniveau [31] als Arbeitshypothese, müßten mit der Nachreife der Samen nur wenige RNA- und Proteinsynthesen eingeschaltet werden, die durch das Gesamt-Einbau-Experiment nicht zu erfassen sind. Entsprechend dieser Hypothese dürften sich dormante und nachgereifte *Agrostemma*-Embryonen bei einem insgesamt einheitlichen Grundstoffwechsel nur in wenigen Eiweiß- und RNA-Synthesen unterscheiden, die jedoch für die weitere Entwicklung der Embryonen von entscheidender Bedeutung sein müßten [11]. Um derartig spezifische Unterschiede im Synthesemuster blockierter und aktivierter Embryonen zu erfassen, erschien es uns aussichtsreich, die während der Quellung dormanter und nachgereifter Embryonen synthetisierten Proteine durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufzutrennen. Zum exakten Vergleich der in dormanten und nachgereiften Embryonen gebildeten Proteine auf dem Gel war eine Doppelmarkierung (dormante Embryonen wurden mit ^{14}C - und nachgereifte mit ^3H -L-Leucin gefüttert) erforderlich, so daß die unterschiedlich markierten Proteine auf einem Gel gemeinsam aufgetrennt werden konnten. Abbildung 5, die als Beispiel für eine typische Trennung ausgewählt wurde, läßt ein nicht völlig identisches, aber doch sehr ähnliches Markierungsmuster beider Varianten erkennen. Diese Resultate—allein noch nicht beweiskräftig—machen es jedoch wahrscheinlich, daß in blockierten und aktivierten Embryonen während der Quellung im wesentlichen die gleichen Proteine gebildet werden, wobei Unterschiede nur in wenigen Proteinfractionen zu erwarten sind. Auch diese Befunde bestärken uns in der Auffassung, daß die Samenruhe von *A. githago* nicht durch einen generellen, sondern durch

einen spezifischen Block bedingt wird. Allerdings müßte diese Schlußfolgerung durch eine diskoelektrophoretische Auftrennung einzelner Proteinfractionen weiter erhärtet werden. Eine Untersuchung der Kernproteine ist in Vorbereitung.

Durch die Suche nach solchen spezifischen metabolischen Blocks könnten die Schaltstellen, an denen über Ruhe und Aktivität der Samen entschieden wird, gefunden werden. Neben der RNA- und Proteinbiosynthese laufen in dormanten Embryonen von *A. githago* auch Prozesse des Grundstoffwechsels, beispielsweise die Atmung [32], mit unverminderter Intensität ab. Dagegen weisen dormante Embryonen noch vor dem Radiculadurchbruch einen geringeren ^3H -Thymidin-Einbau in DNA als nachgereifte auf [33, 34]. Möglicherweise ist die DNA-Synthese an der Überwindung der Samenruhe von *A. githago* direkt oder indirekt beteiligt. Da die Replikation des Genoms heute im Zusammenhang mit der Steuerung von Differenzierungs- und Entwicklungsprozessen betrachtet wird [35–37], erscheint es uns lohnenswert, diese Hypothese zu überprüfen.

Ansatzpunkte hierfür dürften u. a. eine genaue Analyse der an der Initiation der DNA-Synthese beteiligten Proteine und ihrer Synthese während der Quellung blockierter und aktivierter Samen bieten (Initiatorproteine, Thymidinkinase, Thymidylatsynthetase, DNA-Polymerasen [38]). Diese Vorstellungen würden allerdings stark erschüttert werden, wenn es sich herausstellte, daß die DNA-Synthese für die Keimung der *Agrostemma*-Samen unwesentlich ist, wie das von Haber *et al.* [39, 40] (vgl. auch [41]) für Weizenkaryopsen und Salatfrüchte wahrscheinlich gemacht wurde. Unsere Untersuchungen über den Einfluß von spezifischen Inhibitoren auf die Keimung und DNA-Synthese sprechen jedoch dafür, daß die Aufnahme der DNA-Synthese eine wesentliche Voraussetzung für den Keimungsprozeß darstellt [33].

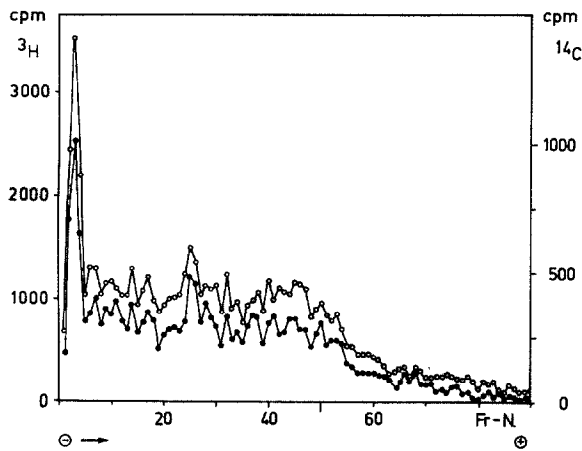


Abb. 5. Trennung radioaktiv markierter Proteine durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Dormante und nachgereifte Samen von *Agrostemma githago* wurden 15 h bei 20°C dunkel angequollen; anschließend wurden je 10 Embryonen isoliert. Die nachgereiften Embryonen wurden 5 hr in 60 μCi ^3H -L-Leucin-(4,5) (spez. Akt. 55 Ci/mmol), die dormanten Embryonen in 4 μCi ^{14}C -L-Leucin-(u) (spez. Akt. 185 mCi/mmol) inkubiert. Die ^3H - und ^{14}C -markierten Proteine wurden gemeinsam extrahiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Messung der ^3H - und ^{14}C -Aktivitäten der 1 mm starken Gelscheiben erfolgte getrennt im Tri Carb. —○—: ^3H -markierte Proteine aus nachgereiften Embryonen; —●—: ^{14}C -markierte Proteine aus dormanten Embryonen.

EXPERIMENTELLES

Bestimmung der RNA- und Proteinbiosynthese. Als Untersuchungsmaterial dienten dormante und nachgereifte Samen von *Agrostemma githago*, Sorte Gatersleben, Ernten 1973 und 1974 (vergleichsweise auch 1966, 1968, 1970). Während nachgereifte *Agrostemma*-Samen bei 20°C nach kurzer Quellungszeit (etwa 24–30 hr) zum Radiculadurchbruch gelangen, ist die Entwicklung der dormanten Samen vollständig blockiert (zur Keimungsphysiologie der *Agrostemma*-Samen vgl. [42]). Die RNA- und Proteinbiosynthesen wurden wie früher beschrieben [17] modifiziert nach Mans und Novelli [43] bestimmt. Je 20 Samen wurden in Petrischalen auf feuchtem Fließpapier bei 20° dunkel angequollen. Nach einer bestimmten Quellungszeit wurden die Embryonen isoliert und 1 hr mit 3 μCi /2,5 ml ^{14}C -DL-Leucin-(1) (spezifische Aktivität 25 mCi/mmol, Dresden, DDR) bzw. 2 hr mit 2,5 μCi /2,5 ml ^{14}C -Uracil-(2) (spez. Akt. 53 mCi/mmol, Prag) inkubiert. Die Extraktion der Proteine erfolgte mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5 und 1% Na-Dodecylsulfat (SDS), die der RNA mit 0,01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5, 0,5% SDS, 0,1% 8-Hydroxychinolin und 0,05% Bentonit. Die Incorporationsrate wurde in der Überstands- und Sedimentfraktion der zentrifugierten Extrakte nach Mans und Novelli [43] ermittelt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationspektrometers Tri Carb (Packard). Die Aufnahme- bzw. Einbaureate wurde in Impulsen pro Minute und Embryo oder in % Einbau bezogen auf die Gesamtaufnahme angegeben. Abweichungen von den hier mitgeteilten experimentellen Bedingungen werden in den Abbildungslegenden angegeben.

RNA-Hybridisierung an Oligo-dT-Cellulose. 40 Embryonen wurden aus 19 hr bei 20°C gequollenen dormanten und nachgereiften Samen isoliert und 3 h in 100 µCi ³H-Uracil-(5) (spez. Akt. 27,3 Ci/mmol, Prag) inkubiert. Die ³H-Uracil-markierte RNA wurde mit Tris-HCl-Puffer, 0,1 M, pH 9,0, 1% SDS, 0,01 M MgCl₂, 0,5% Bentonit, 0,25% 8-Hydroxychinolin extrahiert und nach Brawerman [44] und Perry *et al.* [45] präpariert (Das erhaltene RNA-Präparat war frei von Bruchstücken, wie vergleichende gelelektrophoretische Trennungen ergaben). Die mit Äthanol gefällte RNA wurde in 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, 0,005 M Na₂-EDTA, 0,4 M NaCl, 0,1% SDS (Bindungspuffer) aufgenommen. Zur Gewinnung der Poly(A)-mRNA wurde ein Teil der RNA bei Zimmertemperatur auf eine Oligo-dT-Cellulose-Säule gegeben, deren Kapazität vorher mit Poly(A) überprüft wurde. Durch sorgfältiges Waschen mit Bindungspuffer konnte die nicht hybridisierte RNA vollständig von der Säule gelöst werden. Die Elution der Poly(A)-mRNA gelang mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,0, 0,0005 M Na₂-EDTA, 0,1% SDS (Elutionspuffer) bei 50°C. Die RNA wurde auf Filterpapierscheiben (φ2 cm) aufgetragen und nach Mans und Novelli [43] gewaschen (ohne Hydrolyse mit 5%iger Trichloressigsäure), anschließend wurde die Radioaktivität gemessen.

Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Embryoproteine wurden je 10 Embryonen aus dormanten und nachgereiften *Agrostemma*-Samen, die 17 hr bei 20° im Dunkeln gequollen waren, isoliert und 5 h mit 60 µCi ³H-L-Leucin-(4,5) (spez. Akt. 55 Ci/mmol, Amersham) bzw. mit 4 µCi ¹⁴C-L-Leucin-(u) (spez. Akt. 185 mCi/mmol, Prag) inkubiert. Die mit ¹⁴C-(dormant) und mit ³H-L-Leucin (nachgereift) gefütterten Embryonen wurden gemeinsam in 1 ml 0,005 M Tris-Glycin-Puffer, pH 8,3 homogenisiert (Doppelmarkierung). Je 100 µl der mit Sephadex G 50 gefiltrierten Extrakte wurden auf 7,5%ige Polyacrylamidgele (vgl. [46], p. 42, Gelsystem 1, Gelmaße 0,8 × 8 cm) aufgetragen und etwa 3 hr bei 6 mA/Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte mit Coomassie-Blau G 250. Die kurze Zeit bei -20° eingefrorenen Gele wurden mit einem Gelschneider nach Matsumura *et al.* [47] in 1 mm dicke Scheiben zerschnitten, die durch die Zugabe von 250 µl 30%iges H₂O₂, das 1% konz. NH₄OH enthielt, nach 2 bis 3 hr bei 50° aufgelöst werden konnten. In den ersten Versuchen wurden 0,1 ml dieser Lösung auf Filterpapierscheiben aufgetragen, getrocknet und die ³H- und ¹⁴C-Aktivität getrennt mit einem Toluol-Szintillator im Tri Carb-Szintillations-Spektrometer gemessen. Hierbei zeigte sich jedoch, daß nach Auflösung der Gelscheiben durch ammoniakalisches H₂O₂ und nachfolgendes Auftrocknen auf Filterpapierscheiben ein Teil der Radioaktivität verloren geht. Wir haben deshalb die Gelscheiben in gut verschließbaren LSC-Küvetten aufgelöst und die ³H- und ¹⁴C-Radioaktivität nach Zugabe von 10 ml Aquasol gemessen, wobei Korrekturfaktoren wegen der nicht völligen Trennung der ³H- und ¹⁴C-Aktivität eingefügt worden sind.

Anerkennungen—Herrn Dr. E. Serfling danken wir für die freundliche Überlassung einiger Chemikalien und für methodische Hinweise, Frau I. Bernschein für zuverlässige technische Assistenz.

LITERATUR

1. Tuan, D. Y. H. and Bonner, J. (1964) *Plant Physiol.* **39**, 768.
2. Rost, T. L. (1972) *Am. J. Botany* **59**, 607.
3. Bradbeer, J. W. and Colman, B. (1967) *New Phytol.* **66**, 5.
4. Wood, A. and Bradbeer, J. W. (1967) *New Phytol.* **66**, 17.
5. Jarvis, B. C., Frankland, B. and Cherry, J. H. (1968) *Planta* **83**, 257.
6. Barnett, L. B., Adams, R. E. and Ramsey, J. A. (1974) *Life Sci.* **14**, 653.
7. Yamamoto, N., Sasaki, S., Asakawa, S. and Hasegawa, M. (1974) *Plant Cell Physiol.* **15**, 1143.
8. Chen, S. S. C. and Varner, J. E. (1970) *Plant Physiol.* **46**, 108.
9. Frankland, B., Jarvis, B. C. and Cherry, J. H. (1971) *Planta* **97**, 39.
10. Fountain, D. W. and Bewley, J. D. (1973) *Plant Physiol.* **52**, 604.
11. Hecker, M. und Borris, H., unveröffentlicht.
12. Hecker, M. (1974) *Biochem. Physiol. Pflanzen* **166**, 461.
13. Rejman, E. and Buchowicz, J. (1971) *Phytochemistry* **10**, 2951.
14. Hallam, N. D., Roberts, B. E. and Osborne, D. J. (1972) *Planta* **105**, 293.
15. Walbot, V. (1972) *Planta* **108**, 161.
16. Sieliwanowicz, B. and Chmielewska, I. (1973) *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.* **21**, 399.
17. Hecker, M. (1974) *Biol. Rundschau* **12**, 277.
18. Walbot, V., Capdevila, A. and Dure, K. S. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **60**, 103.
19. Hecker, M. (1976) *Experientia* **32**, 50.
20. Hecker, M. (1973) *Wiss. Zschr. Univ. Greifswald, Math.-Nat. Reihe* **22**, 17.
21. Baum, F. und Borris, H. (1967) in: *Int. Symp. Physiol., Ökol. u. Biochemie d. Keimung*, p. 549. Greifswald 1967.
22. Abdul-Baki, A. A. (1969) *Plant Physiol.* **44**, 733.
23. Bewley, J. D. and Black, M. (1972) *Can. J. Botany* **50**, 53.
24. Fujisawa, H. (1966) *Plant Cell Physiol.* **7**, 185.
25. Walton, D. C. and Soofi, G. S. (1969) *Plant Cell Physiol.* **10**, 307.
26. Dure, L. S. and Waters, L. C. (1966) *Science* **147**, 410.
27. Chen, D. and Osborne, D. J. (1970) *Nature* **226**, 1157.
28. Van De Walle, C. (1973) *FEBS Letters* **34**, 31.
29. Fraser, R. S. S. (1975) *European J. Biochem.* **50**, 529.
30. Ingle, J., Hepburn, A. G., Baulcombe, D. and Chapman, K. (1975) *Abstr. III. Intern. Bot.-Kongreß Leningrad*, p. 359.
31. Günther, E. und Borris, H. (1975) *Biol. Zbl.* **94**, 45.
32. Günther, G. und Borris, H. (1967) in: *Int. Symp. Physiol., Ökol. u. Biochemie d. Keimung*, p. 527. Greifswald 1967.
33. Hecker, M. (1975) *Biol. Plant.*, **17**, 339.
34. Hecker, M. und Huth, A. (1975) *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **167**, 261.
35. Holtzer, H., Weintraub, H., Mayne, R. and Mochan, B. (1972) *Curr. Top. Develop. Biol.* **7**, 229.
36. Rutter, W. Y., Pichet, R. C., Morris, P. W. (1973) *Ann. Rev. Biochem.* **42**, 601.
37. Fellenberg, G. (1974) *Fortschr. Bot.* **36**, 147.
38. Mory, Y. Y., Chen, D. and Sarid, S. (1972) *Plant Physiol.* **49**, 20.
39. Haber, A. H., Carrier, W. L. and Foard, D. E. (1961) *Am. J. Botany* **48**, 431.
40. Haber, A. H. (1968) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **19**, 463.
41. Kern, H. (1975) *Z. Naturforsch.* **300**, 300.
42. Borris, H. (1956/57) *Wiss. Zschr. Univ. Greifswald, Math.-nat. Reihe* **6**, 251.
43. Mans, R. J. and Novelli, G. D. (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* **94**, 48.
44. Brawerman, G. (1973) *Methods in Cell Biol.* **VII**, 1.
45. Perry, R. P., La Torre, J., Kelley, D. E. and Greenberg, J. R. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **262**, 220.
46. Maurer, H. R. (1968) *Disk-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese*, Berlin.
47. Matsumura, T. and Noda, H. (1973) *Analyt. Biochem.* **56**, 571.