

## DER STOFFWECHSEL VON INDOLDERIVATEN IN *SINAPIS ALBA* L.—I.

### SYNTHESE UND UMSETZUNG VON L-TRYPTOPHAN IN ETIOLIERTEN HYPOKOTYLSEGMENTEN NACH APPLIKATION VON INDOL-2-<sup>14</sup>C

H. SCHRAUDOLF

Botanisches Institut der Universität Giessen, Germany

(Eingegangen 18 Mai 1965)

**Zusammenfassung**—Hypokotylsegmente etiolerter Keimlinge von *Sinapis alba* L. metabolisieren Indol-2-<sup>14</sup>C. Hauptumsetzungsprodukte sind dabei L-Tryptophan und dessen Derivate Glucobrassicin und Neoglucobrassicin. Die Synthese von L-Tryptophan aus Indol wird gefördert durch Zusatz von L-Serin, Glycin, L-Methionin und L-Homoserin zum Inkubationsmedium. L-Leucin Hemmt Indolaufnahme und Indolumsetzung. Weder IES noch IAN konnten als markierte Umsetzungsprodukte des Indol-2-<sup>14</sup>C in *Sinapis* nachgewiesen werden.

**Abstract**—Hypocotyl segments of etiolated seedlings of *Sinapis alba* L. are found to metabolize indole-2-<sup>14</sup>C. Tryptophan and its derivatives glucobrassicin and neoglucobrassicin were identified as the main reaction products. The metabolism of indole to tryptophan was stimulated by addition of L-serine, glycine, L-methionine and L-homoserine to the incubation medium. L-leucine was found to inhibit both uptake and reaction. Neither labelled IAA nor IAN could be detected as metabolites of the indole-2-<sup>14</sup>C.

### EINLEITUNG

WÄHREND Tryptophanase und Tryptophansynthetase in Mikroorganismen und tierischen Geweben zu den bestcharakterisierten Enzymsystemen des Aminosäurestoffwechsels zählen,<sup>1</sup> liegen zur Frage der Biogenese des Tryptophans in höheren Pflanzen nur wenige Angaben vor. Eine Tryptophansynthetasereaktion in Spermatophyten wurde *in vivo* und *in vitro* bei verschiedenen Objekten wahrscheinlich gemacht,<sup>2-8</sup> die Biogenese des Indolrings bislang nur in Gerstenblättern näher untersucht.<sup>6</sup>

Diese spärlichen Kenntnisse über die Synthese des Tryptophans sind um so erstaunlicher, als von dieser Aminosäure allgemein die Biogenese der physiologisch so bedeutungsvollen Indolauxine abgeleitet wird.<sup>9</sup> Die Existenz dieses Synthesewegs, der für Mikroorganismen zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, wurde für höhere Pflanzen in jüngster Zeit verschiedentlich in Frage gestellt,<sup>10, 11</sup> und Thimann diskutiert in diesem Zusammenhang die Möglichkeit einer Parallelsynthese von Aminosäure und Phytohormon aus einer gemein-

<sup>1</sup> W. SAKAMI und H. HARRINGTON, *Ann. Rev. Biochem.* **32**, 355 (1963).

<sup>2</sup> S. G. WILDMAN, M. FERRI und J. BONNER, *Arch. Biochem.* **13**, 131 (1947).

<sup>3</sup> J. B. MUDD und S. ZALIK, *Can. J. Botany* **36**, 467 (1958).

<sup>4</sup> J. B. GREENBERG und A. GALSTON, *Plant Physiol.* **34**, 467 (1959).

<sup>5</sup> V. L. KRETOVICH und O. L. POLYANOVSKII, *Biokhimia* **24**, 917 (1959).

<sup>6</sup> F. WIGHTMAN, M. D. CHRISHOLM und A. C. NEISH, *Phytochem.* **1**, 30 (1961).

<sup>7</sup> L. D. PRUSAKOVA, *Fiziol. Rastenii Akad. Nauk. Ukr. R.S.R.* **7**, 170 (1960).

<sup>8</sup> L. D. PRUSAKOVA, *Fiziol. Rastenii Akad. Nauk. Ukr. R.S.R.* **9**, 446 (1962).

<sup>9</sup> C. H. FAWCETT, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **12**, 345 (1961).

<sup>10</sup> J. A. BENTLEY, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **9**, 47 (1958).

<sup>11</sup> K. V. THIMANN, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **15**, 1 (1964).

samen Vorstufe.<sup>11</sup> Diese Vorstufe könnte Indolglycerinphosphat bzw. Indol selbst sein. Die hohe Ausbeute von Indolyl-3-essigsäure bei der enzymatischen Umsetzung von Indol durch ein Präparat aus Tomatenpflanzen, über die Mudd und Zalik berichten,<sup>3</sup> liesse sich in diesem Sinne interpretieren.

Wir haben daher im Anschluss an Untersuchungen zum Stoffwechsel von *DL*-<sup>14</sup>C-Tryptophan in *Sinapis*keimlingen<sup>12</sup> begonnen, auch die Frage der Biosynthese des Tryptophans und eine evtl. diese begleitende Genese von Indolauxinen mit Hilfe markierten Indols erneut zu untersuchen. Die ersten *in vivo* erzielten Ergebnisse sind hier zusammengefasst.

#### ERGEBNISSE

##### *Tryptophansynthese aus Indol-2-<sup>14</sup>C und ihre Beeinflussung durch Aminosäuren*

Die Resultate der Inkubation von *Sinapis*hypokotylsegmenten mit Indol-2-<sup>14</sup>C zusammen mit verschiedenen Aminosäuren sind in Tab. 1 wiedergegeben.

Die Aufnahme von Indol führt zu einer rasch anlaufenden Synthese von Tryptophan. Schon 5 Minuten nach Inkubationsbeginn ist nach papierchromatographischer Auftrennung des Methanolextrakts eine Markierung dieser Aminosäure nachweisbar. Aufnahme und Umsetzungsrate lassen sich durch gleichzeitiges Angebot von L-Serin, Glycin, L-Methionin und L-Homoserin signifikant erhöhen. L-Leucin hemmt Indolaufnahme und Tryptophansynthese, während D-Serin in der verabreichten Konzentration ohne messbaren Einfluss auf beide Prozesse bleibt. Eine Fütterung mit L-Cystein, das ebenfalls zur Seringruppe des Aminosäurestoffwechsels gehört, führt im Verlauf der Inkubationszeit zu einem totalen Verlust der Turgeszenz und frühen Absterben der Segmente.

Diese in Tab. 1 dargestellten Beziehungen waren mit geringen quantitativen Abweichungen in 4 Wiederholungen reproduzierbar. Die Ergebnisse sprechen für die Existenz einer Tryptophansynthetase in Keimlingen von *Sinapis*.

Ein papierchromatographischer Nachweis von freiem Serin, Glycin und Methionin in den Segmenten war möglich und erklärt die hohe Umsetzungsrate auch ohne zusätzliche Applikation der genannten Aminosäuren (Kontrolle in Tab. 1).

Die Differenzen der Gesamtaktivitäten zwischen den einzelnen Behandlungsarten gehen fast ausschliesslich auf Unterschiede im Aktivitätsanteil des Tryptophans und seiner Derivate (Glucobrassicin, Restaktivität) zurück. Die Umsetzungsrate des Indols bestimmt demnach nicht un wesentlich die Aufnahmgeschwindigkeit.

Methodisch erwies sich allerdings die Analyse der <sup>14</sup>C-Indol-Umsetzung mit Hilfe eines Methandurchflusszählrohrs als unzureichend. Die auch nach Beendigung der Inkubationszeit in allen Ansätzen mit niedriger Umsetzungsrate auffällig steigende Gesamtaktivität hat ihre Ursache in der leichten Flüchtigkeit des Indols. Diese führt zu Aktivitätsverlusten im Verlauf der Aufarbeitung, Chromatographie und Vorbereitung zur Messung. Die Verluste gehen parallel mit dem Gehalt an freiem Indol zurück. Prüfung an Stichproben im Flüssigkeits-Scintillations-Spektrometer ergaben gleichbleibende Gesamtaktivitäten. Wie jedoch die Daten nach 24 hr bzw. 48 hr Umsetzungszeit zeigen, einer Zeit, zu der freies Indol chromatographisch nicht mehr nachweisbar ist, sind diese Verluste für die beschriebene Beeinflussung der Tryptophansynthese durch Aminosäuren unerheblich.

Umsetzung von Indol-2-<sup>14</sup>C konnte neben *Sinapis* auch noch in Geweben von *Musa*, *Phaseolus* und *Cereocactus* nachgewiesen werden. Die Tryptophansynthese in Epikotylsegmenten von *Phaseolus aureus* (mung beans) konnte durch Zusatz von L-Serin nicht gefördert werden.

<sup>12</sup> H. SCHRAUDOLF und F. BERGMANN, *Planta*, Im Druck.

TABELLE 1. AUFNAHME UND UMSATZUNG VON INDOL-2-<sup>14</sup>C IN HYPOCOTYLSEGMENTE VON *Sinapis alba* BEI GLEICHZEITIGER APPLIKATION VON AMINOSÄUREN

Applikation	Aktivität nach der Inkubation (6 hr)						Aktivität nach 24 hr Umsetzungszeit						Aktivität* nach 48 hr Umsetzungszeit					
	Gesamt Tryptophan			Glucobrass. Restaktivit.			Gesamt Tryptophan			Glucobrass. Restaktivit.			Gesamt Tryptophan			Glucobrass. Restaktivit.		
	Gesamt (Ipm)*	(Ipm) (%)	(Ipm) (%)	Gesamt (Ipm)	(Ipm) (%)	(Ipm) (%)	Gesamt (Ipm)	(Ipm) (%)	(Ipm) (%)	Gesamt (Ipm)	(Ipm) (%)	(Ipm) (%)	Gesamt (Ipm)	(Ipm) (%)	(Ipm) (%)	Gesamt (Ipm)	(Ipm) (%)	(Ipm) (%)
Kontrolle	48,7	24,7	51,0	1,8	3,6	3,4	6,9	68,8	31,2	45,3	12,2	17,7	8,3	12,0				
L-Serin	149,9	119,8	80,2	2,3	1,5	2,8	1,9	149,0	111,0	74,4	12,1	8,1	7,4	5,0				
D-Serin	48,7	25,9	61,3	1,4	2,8	2,3	4,7	68,8	41,3	60,0	7,0	10,1	7,4	10,7				
L-Homoserin	60,1	38,1	63,3	1,4	1,7	2,7	4,4	82,3	49,9	60,6	10,1	12,2	7,5	9,1				
L-Leucin	37,0	17,5	47,3	1,4	3,7	2,4	6,5	55,0	23,9	43,4	9,5	17,2	8,8	16,0				
Kontrolle	43,8	25,9	59,1	1,5	3,3	2,7	6,2	65,9	36,3	55,0	9,9	15,0	8,3	12,5	67,7	20,3	29,9	17,0
L-Serin	119,5	100,9	84,3	1,7	1,4	2,4	2,0	115,4	82,4	71,4	10,7	9,2	8,6	7,4	120,2	57,9	48,1	23,5
L-Methionin	64,2	45,3	70,5	1,1	1,6	2,5	2,5	76,2	48,8	64,0	8,5	11,1	6,8	8,9	84,1	39,3	46,7	18,0
Glycin	98,2	77,4	78,8	2,3	2,3	2,5	2,5	95,0	66,3	69,7	9,4	9,8	7,1	7,4	97,3	46,6	47,8	17,7

\* Ipm=Impulse  $\times 10^3$ /min.

† % = prozentualer Anteil an der Gesamtaktivität.

### Tryptophanumsetzung

Unter den methanolöslichen Umsetzungsprodukten des Indol-2-<sup>14</sup>C überwiegen neben Tryptophan die Derivate dieser Aminosäure, die Isothiocyanatglucoside Glucobrassicin und Neoglucobrassicin<sup>12</sup> (Abb. 1). Die Aktivität dieser Verbindungen, die auf Kosten der Tryptophanaktivität im Verlauf der Umsetzungszeit kontinuierlich zunimmt, ist beim Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen nicht proportional der Aktivität ihrer Ausgangsverbindung.

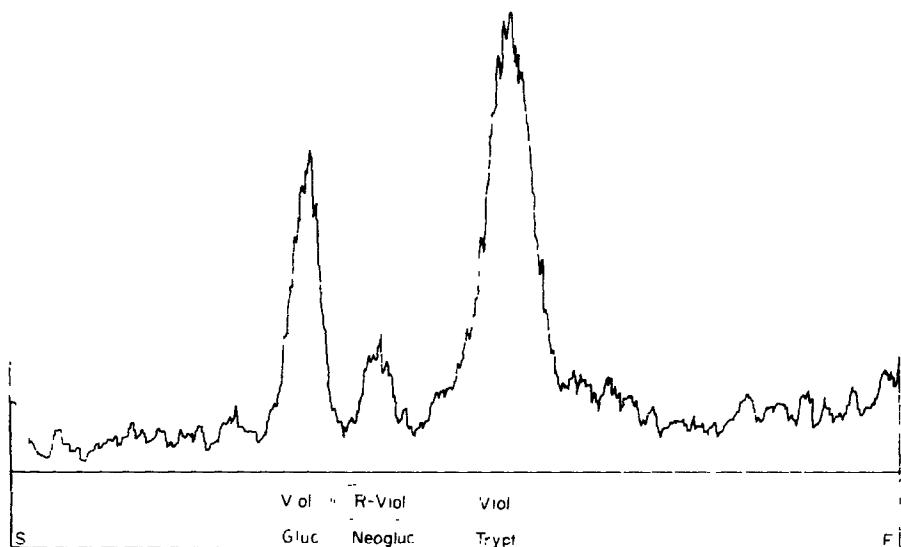


ABB. 1. VERTEILUNG DER RADIOAKTIVITÄT DES METHANOLEXTRAKTS VON SINAPIS HYPOKOTYLEN GEFLÜTTERT MIT INDOL-2-<sup>14</sup>C. UMSETZUNGSZEIT 24 hr. LÖSUNGSMITTEL BUTANOL : EISSESSIG : WASSER 4:1:2. FARBREACTION MIT *p*-DIMETHYLAMINOZIMTALDEHYD.

Nicht proportional der Tryptophanaktivität ist auch die in den Segmenten nach Extraktion mit Methanol und Wasser verbleibende Restaktivität. Sie ist zunächst sowohl relativ als auch absolut in allen Ansätzen mit Aminosäurezufütterung und hoher Umsatzrate niedriger als in der Kontrolle.

Da es sich bei dieser Fraktion vornehmlich um in Proteine aufgenommene Aktivität handelt, indiziert die rasche Aktivitätszunahme eine Neusynthese von Proteinen in den Hypokotylsegmenten im Verlauf der Umsetzungszeit, obwohl eine positive Eiweissbilanz nicht nachzuweisen ist (Tab. 2).

TABELLE 2. N-VERTEILUNG IN 40 ETIOLIERTEN HYPOKOTYLSEGMENTEN VON *Sinapis alba* NACH EXSTIRPATION UND NACH 48 hr. LÄGERUNG IM DUNKELN. 24

t (hr)	Protein N ( $\mu$ g)	Löslich N ( $\mu$ g)	Protein N (%)
0	315	728	30.2
48	293	716	29.0

Zum Nachweis des Einbaus neusynthetisierten Tryptophans in die Proteinfraktion homogenisierten wir 40 Segmente, 48 hr nach Inkubation mit Indol-2-<sup>14</sup>C in 2,0 ml Citratpuffer (pH 7,0; 0,1 M). Nach Zentrifugation (15 min, 20 000 g) betrug die Aktivität des überstehenden, klaren Extrakts 81 000 Ipm. Die hochmolekularen Anteile wurden über Sephadex-25 abgetrennt und die Proteine dieser Fraktion durch Zusatz von 20% Trichloressigsäure (1:1) gefällt. Nach wiederholtem Waschen mit TCES (10%) betrug die Aktivität des Eiweissniederschlags 2150 Ipm (2,6% der pufferlöslichen Anteile). Nach Hydrolyse mit Ba(OH)<sub>2</sub> konnte Radioaktivität im Tryptophan papierchromatographisch nachgewiesen werden.

Die in Tab. 1 auftretenden Differenzen zwischen der angeführten Gesamtaktivität des Methanoleextrakts und der Summe der Einzelsubstanzen findet sich zum Teil in freiem Indol und Neoglucobrassicin, zum Teil in noch nicht identifizierten Verbindungen unterschiedlicher *R<sub>f</sub>*-Werte. Generell ist die "Schmieraktivität" auf Chromatogrammen von Extrakten nach <sup>14</sup>C-Indolfütterung um ein Vielfaches höher als bei entsprechender Applikation von <sup>14</sup>C-Tryptophan.<sup>12</sup>

Qualitative Unterschiede in der Zusammensetzung der Indolderivate nach Fütterung mit den verschiedenen Aminosäuren treten nicht auf. N-Malonyltryptophan, das Umsetzungsprodukt von D-Tryptophan in *Sinapis alba*, konnte auch nach Fütterung von D-Serin nicht nachgewiesen werden.

Die Aktivität der Wasserextrakte blieb bei allen Versuchsgruppen im 1%-Bereich und ist daher in der Tabelle nicht gesondert aufgeführt.

Eine Hemmung der Glucobrassicinsynthese durch D-Serin, die sich aus den in Tab. 1 wiedergegebenen Werten andeutet, ist Gegenstand einer gesonderten Untersuchung.

#### *Bildung von Indolauxinen*

Eine Synthese von Indolyl-3-essigsäure oder Indolyl-3-acetonitril kann innerhalb der Empfindlichkeit der angewandten Methode mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Bei keinem der beschriebenen Ansätze fand sich nach Auf trennung in Trichloräthylen: Eisessig Radioaktivität im Bereich der *R<sub>f</sub>*-Werte dieser Verbindungen. Diese Ergebnisse stimmen mit Resultaten überein, die bei Applikation von ringmarkiertem DL-Tryptophan erzielt worden sind.<sup>12</sup>

Eine Bildung von Indolauxinen war auch bei Fütterung der markierten Verbindungen an *Musa*, *Phaseolus aureus* und *Cereocactus* nicht nachweisbar, obgleich bei diesen Objekten Umsetzungszeiten bis 10 Tage eingehalten werden konnten.

#### *Umsetzung in vitro*

Homogenisate aus etiolierten Keimlingen von *Sinapis* zeigen keine Tryptophansynthetaseaktivität. Die Ursache dafür fanden wir in einer hohen Phosphataseaktivität der Extrakte. Diese Phosphatase, die ein pH-Optimum von 5,2 aufweist und deren Aktivität durch Zusatz von Mg<sup>2+</sup> nicht beeinflusst werden kann, spaltet das Coenzym der Tryptophansynthetase Pyridoxalphosphat innerhalb kürzester Zeit zu Pyridoxal und anorganischem Phosphat. Der rasche Coenzymverlust kann durch papierelektrophoretische Auf trennung nachgewiesen werden. Eine Abtrennung der Phosphataseaktivität von der Tryptophansynthetase ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

#### DISKUSSION

Der überaus rasche Einbau von markiertem Indol in die freie und gebundene Tryptophanfraktion des Sinapishypokotyls, vor allem auch die starke Förderung der Tryptophan-

synthese durch gleichzeitige Fütterung mit L-Serin, macht die Existenz eines Enzymsystems vom Typ der Tryptophansynthetase überaus wahrscheinlich. Negative Resultate die Greenberg und Galston<sup>4</sup> mit Enzympräparaten aus Kohlblättern, einer anderen Cruciferengattung, erhielten, erklären sich leicht aus der von uns nachgewiesenen hohen Phosphataseaktivität in Cruciferenhomogenisaten und die durch sie verursachte Spaltung des Coenzims der Tryptophansynthetase Pyridoxalphosphat.<sup>13,14</sup> Eine Spaltung, auf die Happold<sup>15</sup> auch die Aktivitätsabnahme alternder Tryptophansynthetasepräparate aus *Escherichia coli* zurückführen konnte.

Die gleichfalls hohe Einbaurate von markiertem Indol bei Gegenwart von Glycin erfordert die Präsenz eines Enzymsystems, das die Umwandlung Glycin-*L*-Serin katalysiert. Eine solche Serinaldolase oder Serinhydroxymethylase ist in Mikroorganismen und tierischen Geweben weit verbreitet. In Weizenblättern wiesen Tolbert und Cohan<sup>16</sup> wie auch Rabsen *et al.*<sup>17</sup> ein derartiges Enzymsystem nach. Dabei zeigte sich, dass Glycin selbst die Funktion des zur Nettosynthese von *L*-Serin notwendigen C<sub>1</sub>-Donators übernehmen kann (s.a. <sup>18, 19, 20</sup>), ohne dass eine primäre Bildung von Glyoxal notwendig wäre. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen war ein Ersatz des *L*-Serin durch Glycin bei der Biosynthese von Cystein in Rübenschichten nicht möglich.<sup>21</sup>

Ob die Förderung der Tryptophansynthese durch L-Methionin auf eine verstärkte Bildung von  $N^5,N^{10}$ -Methylentetrahydrofolat (HCHO:FH4) mit Hilfe der entsprechenden, aus anderen Organismen bekannten Reduktase und einer Übertragung des aktiven  $C_1$ -Körpers auf zelleigenes Glycin zurückgeführt werden kann, muss durch entsprechende Markierungsversuche geklärt werden. Offen ist vorläufig auch die fördernde Wirkung des Homoserins und die signifikante Leucinhemmung.

Die Ergebnisse unserer Fütterungsversuche sprechen für die Existenz der im folgenden Schema (Abb. 2) dargestellten Stoffwechselzusammenhänge bei der Biosynthese des Tryptophans in Keimlingen von *Sinapis alba*.

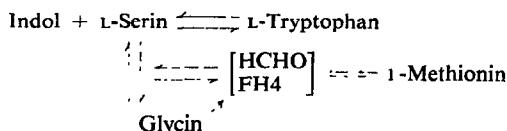


ABB. 2. BIOSYNTHESE DES TRYPTOPHAN IN KEIMLINGEN VON *Sinapis alba*.

Ein Einbau von Aminosäuren in die Proteinfraktion höherer Pflanzen auch bei abnehmendem Gesamtproteingehalt ist seit den Arbeiten von Vickery *et al.*<sup>22</sup> bekannt. Seit ihren Versuchen über den Einbau von  $^{15}\text{N}$  in die Proteinfraktion liegen eine ganze Reihe von Daten über die Existenz eines Gleichgewichts Protein-freie Aminosäuren vor, und erst kürzlich haben Holmsen und Koch<sup>22</sup> die Halbwertzeit der Proteine wachsender Tabakpflanzen mit 7

<sup>13</sup> W. W. UMBREIT, W. A. WOOD und I. C. GUNSALUS, *J. Biol. Chem.* **165**, 731 (1946).

<sup>14</sup> C. YANOFSKY, *J. Biol. Chem.* **194**, 279 (1952).

<sup>15</sup> F. C. HAPPOLD, *Nature* **194**, 580 (1962).

<sup>16</sup> N. E. TOLBERT and M. S. COHAN, *J. Biol. Chem.* **204**, 269 (1953).

<sup>17</sup> R. RABSON, N. E. TOLBERT und P. C. KEARNEY, *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 154 (1962).

<sup>13</sup> D. A. RICHERT, R. AMBERG und M. WILSON, *J. Biol. Chem.* 237, 99 (1962).

<sup>19</sup> J. B. PITTS und G. W. CROSBIE, *Biochem. J.* **83**, 55 P (1962).

<sup>20</sup> D. WANG und E. R. WAY GOOD, *Plant Physiol.* 37, 831 (1962).

<sup>21</sup> R. J. ELLIS, *Phytochem.* **2**, 129 (1963).

<sup>22</sup> H. B. VICKERY, C. W. PUCHER, R. SCHÖNHEIMER und D. RITTENBERG, *J. Biol. Chem.* **135**, 531 (1940).

<sup>23</sup> T. W. HOLMSEN und A. L. KOCH, *Phytochem.* 3, 165 (1964).

Tagen ermittelt. Im Gegensatz zur Ansicht von Hellbust und Bidwell,<sup>24</sup> die Proteinumsatz und Wachstum bzw. Morphogenese in einen Kausalzusammenhang stellen, zeigen unsere Ergebnisse, dass auch in isolierten, nicht wachsenden Geweben ein beträchtlicher Einbau von Aminosäuren bei konstanter oder leicht negativer Proteinbilanz nachgewiesen werden kann.

Der beschleunigte Einbau des markierten Indols in die Proteinfraktion der Kontrollsegmente, verglichen mit den Aminosäureansätzen, macht eine Proteolysehemmung durch die in hohen Konzentrationen applizierten Aminosäuren wahrscheinlich. Entsprechende Hemmungen des Eiweissabbaus durch die Fütterung mit Kohlenhydraten oder Aminosäuren sind beschrieben.

Die Frage nach dem Weg der Biosynthese der Indolauxine in *Sinapis alba* ist auch nach der Auswertung unserer Ergebnisse mit <sup>14</sup>C-Indolfütterung noch vollkommen offen. Ganz entsprechend den Ergebnissen einer Applikation von DL-<sup>14</sup>C-Tryptophan kann eine Synthese von IAN oder IES, die bei der zur Verfügung stehenden spezifischen Aktivität mit Hilfe der Tracermethodik nachweisbar wäre, nicht bewiesen werden. Obwohl die erhöhte Schmieraktivität und etliche kleine, nicht identifizierte Peaks, die ausschliesslich bei Indolfütterung auftreten, eine der Tryptophansynthese parallel laufende Umsetzung indizieren, existiert für eine Direktsynthese der Indolauxine aus freiem Indol vorläufig kein Hinweis.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### Beschreibung der Versuche

**Pflanzenmaterial und Inkubation.** Keimlinge von *Sinapis alba* L. (Sorte Giselba, Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Giessen) wurden auf Vermiculite im Dunkeln bei 24° angezogen. Aus 3 Tage alten, etiolierten Keimlingen wurden mit Hilfe einer Schneidevorrichtung 1 cm lange Hypokotylsegmente direkt unterhalb des Plumulahakens entnommen und auf den jeweiligen Versuchslösungen im Dunkeln flottierend inkubiert.

Vorversuche hatten ergeben, dass bei einer Aufarbeitung von 20 Segmenten pro Versuchspunkt eine genügend hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist. Gleichzeitig wird durch Verwendung dieser geringen Frischgewichtsmenge ( $210 \pm 12$  mg) eine genügend rasche Inaktivierung der in Sinapiskeimlingen hochaktiven Myrosinase erzielt und so eine Spaltung der Isothiocyanatglucoside zu Verbindungen mit Auxincharakter im Verlauf der Aufarbeitung vermieden.

Die Inkubationslösung erhielt pro 100 Segmente 5 ml wässrige Lösung von Indol-2-<sup>14</sup>C ( $10^{-3}$  M) und 5 ml dest. Wasser bzw. Aminosäurelösung ( $10^{-1}$  M). Die Inkubationszeit betrug jeweils 6 hr. Anschliessend wurden die Segmente zur Umsetzung des aufgenommenen Indols auf feuchtem Filterpapier im Dunkeln bei 24° gehalten.

### Chemikalien

Indol-2-<sup>14</sup>C war ein Präparat des "Commissariat a l'Energie Atomique", Gif-sur-Yvette (CMM81), das mit p.a. Indol auf eine spezifische Aktivität von  $1 \text{ mc}/2 \times 10^{-3}$  Mol eingestellt worden war. Bei allen verwendeten Aminosäuren handelt es sich um Verbindungen hohen Reinheitsgrads der Firmen Calbiochem und Fluka.

### Extraktion und Aufarbeitung

Die Extraktion der Segmente erfolgte nach Gmelin und Virtanen<sup>25</sup> durch Einbringen in kochendes Methanol. Extrahiert wurde 4 mal mit 10 ml Methanol, dem bei der ersten

<sup>24</sup> J. A. HELLBUST und R. G. S. BIDWELL, *Can. J. Botany* 41, 69 (1963).

<sup>25</sup> R. GMELIN und A. I. VIRTANEN, *Ann. Acad. Sci. Fennicae Ser. A, II*, 107 (1961).

Extraktion jeweils 50  $\mu\text{g}$  inaktive Indolyl-3-essigsäure zugesetzt worden waren. Die methanolischen Extrakte wurden anschliessend bei verminderterem Druck und 25 auf ein Endvolumen von 2 ml eingeengt, die Segmente 4 mal mit je 10 ml Wasser (70°) nachextrahiert und darauf zur Bestimmung der Restaktivität auf Präparateschälchen mehrmals mit 1 ml conc. Ameisensäure in der Wärme extrahiert.

#### *Chromatographie*

Zur Erfassung evtl. vorhandener Radioaktivität in Indolyl-3-essigsäure und Indolyl-3-acetonitril erfolgte die papierchromatographische Auftrennung aliquoter Mengen der Methanolextrakte zunächst in Trichloräthylen:Eisessig 100:2, in wasser dampfgesättigter Atmosphäre,<sup>26</sup> auf Schleicher & Schüll—Papier 2043 b Mgl. Die  $R_f$ -Werte der zu erwartenden Indolverbindungen betragen bei Verwendung dieses Gemisches: Tryptophan = 0,00; Gluco-brassicin = 0,00; Neogluco-brassicin 0,00; IES = 0,35; IAN = 0,83 und Indol = 0,98 und gewährleisten damit eine gute Abtrennung der Indolauxine von den Hauptumsetzungsprodukten.

Nach Auswerten der Chromatogrammstreifen im Radiopapierchromatographen wurden dieselben Streifen erneut, diesmal in Butanol:Eisessig:Wasser 4:1:2 aufgetrennt und anschliessend die Aktivitätsverteilung quantitativ bestimmt.

#### *Aktivitätsbestimmung*

Die Messung der Gesamtaktivität der Extrakte erfolgte unter Berücksichtigung der Selbstabsorption. Die jeweilige Aktivität der Chromatogramme wurde auf die parallel gemessene Gesamtaktivität des einzelnen Extraks umgerechnet. Damit wurden Pipettierfehler bei der Vorbereitung der Chromatogramme aufgehoben. Die qualitative und quantitative Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe eines fensterlosen Methandurchflusszählrohrs in Verbindung mit einem Zählgerät (FH 49 A) und Chromatogramm-Auswertegerät der Firma Friescke & Hoepfner.

#### *Stickstoffbestimmung*

Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach der Kjeldahlmethode durch Titration des freigesetzten Ammoniaks in Borsäure.

*Anerkennung*—Fräulein I. Puls danke ich für technische Hilfe, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Ministerium für Wissenschaftliche Forschung für Geld- und Sachbeihilfen.

<sup>26</sup> M. KUTACEK, J. NOVAKOVA und M. VALENTA, *Flora* 153, 54 (1963).