

Aufnahme von Ferrioxamin B durch Tomatenpflanzen

Es ist heute üblich, Eisen in komplex gebundener Form zu verabreichen, wenn infolge von hohem pH oder ungünstiger ionaler Zusammensetzung der Nährlösung die Löslichkeit des Eisens reduziert ist, so dass die Versorgung der Pflanze mit Eisen ungenügend wird¹. Der Aufnahmemechanismus von Eisenkomplexen in die Wurzel ist Gegenstand mancher Untersuchung² und vor allem interessiert die Frage, ob der Komplex von der Wurzel intakt inkorporiert wird. Resultate entsprechender Versuche sind teilweise verschieden^{3,4}. In den fraglichen Versuchen wird meistens mit Komplexbildnern vom Typ des Äthylendiamintetraacetates gearbeitet und zum besseren Nachweis der Komplexe in der Pflanze werden die Verbindungen mit ¹⁴C markiert. Aus ¹⁴C-Aktivitätsmessungen in der Pflanze, z.B. Radiographie, wird auf die Anwesenheit des Komplexes in der Pflanze geschlossen. Bei solcher Versuchsanordnung ist allerdings nicht eindeutig entscheidbar, ob der Komplex intakt von der Wurzel aufgenommen wird.

In den vorliegenden Versuchen wurde Ferrioxamin B (FOB), ein Cyclopeptid mit hohen Komplexbildungskonstanten für das dreiwertige Eisen⁵ verwendet⁶. FOB lässt sich in einem Biotest mit *Bacillus subtilis* als Test-

organismus quantitativ bestimmen. Der Test beruht auf der antagonistischen Wirkung von FOB zum Antibiotikum Ferrimycin⁷. Da nur der intakte Komplex auf den Test anspricht, ist FOB ein geeigneter Komplexbildner, um zu prüfen, ob Eisenkomplexe unverändert in die Wurzel aufgenommen und in die Blätter transportiert werden. Verbindungen wie Eisencitrat, -malat, -malonat oder -äthylendiamintetraacetat sprechen auf den Test erst in hohen, unphysiologischen Konzentrationen messbar an (unveröffentlichte Resultate).

Fünf Wochen alte Tomatenpflanzen (1,3–1,5 g Frischgewicht der oberirdischen Teile), aufgezogen in Quarzsand mit Hoagland-Nährlösung, ohne Eisen bei 20–25°C, wurden sorgfältig aus dem Substrat genommen (Heraus-spülen). Die Pflanzen wurden einzeln mit den Wurzeln bis zum Hypokotyl in ein Becherglas mit je 14 ml der eisenfreien Hoagland-Lösung und einem ml einer ⁵⁹FeCl₃- bzw. ⁵⁹Fe-FOB-Lösung gestellt. Nach den in Tabelle I angeführten Zeiten (Kurzzeitexperiment) wurden jeweils vier Pflanzen pro Nährlösungskombination (nur drei Pflanzen bei Fe³⁺-FOB, 90 min) über dem Hypokotyl dekapitiert. Die abgeschnittenen oberirdischen Pflanzenteile wurden zusammengerollt, in ein passendes Reagensglas gesteckt und die ⁵⁹Fe-Aktivität in einer γ -Scintilla-

Tabelle I. Ferrioxamin-B-Aufnahme durch Tomatenpflanzen aus Hoagland-Lösung

Eisen-applikation	Inkubationszeit in min	μg aufgenommenes Eisen in oberirdischen Pflanzenteilen ^a	μg Ferrioxamin B pro ml alkoholischen Extraktes ^b
FeCl ₃	10	<0,1	
Fe ³⁺ -FOB	10	0,2 0,2 0,1 <0,1	<1,0
FeCl ₃	30	<0,1	
Fe ³⁺ -FOB	30	0,3 0,2 0,1 0,2	2,5 2,0 <1,0 2,0
FeCl ₃	60	<0,1 <0,1 0,1 <0,1	
Fe ³⁺ -FOB	60	1,0 0,8 0,5 0,5	3,5 3,0 3,0 1,0
FeCl ₃	90	0,1 0,4 0,1 1,0	
Fe ³⁺ -FOB	90	1,0 1,5 1,5	2,0 3,5 4,0

^a 10% Genauigkeit für 0,1 μg Eisen bei 120 min Zähl-dauer; spez. Aktivität: 300 cpm pro μg Eisen.

^b Bestimmungsgrenze: 1,0 μg FOB pro ml.

Tabelle II. Ferrioxamin-B-Aufnahme durch Tomatenpflanzen aus Wasser

Eisen-applikation	Inkubationszeit in min	μg aufgenommenes Eisen in oberirdischen Pflanzenteilen ^a	μg Ferrioxamin B pro ml alkoholischen Extraktes ^b
FeCl ₃	15	<0,1	
Fe ³⁺ -FOB	15	<0,1	<1,0
FeCl ₃	45	<0,1	
Fe ³⁺ -FOB	45	1,0 1,0 0,5 1,0	3,0 3,0 2,5 2,5
FeCl ₃	90	0,1 <0,1 0,1 <0,1	
Fe ³⁺ -FOB	90	4,0 4,5 4,0	3,5 5,5 4,5

^a 10% Genauigkeit für 0,1 μg Eisen bei 300 min Zähl-dauer; spez. Aktivität: 240 cpm pro μg Eisen.

^b Siehe Tabelle I.

¹ A. WALLACE, Symposium on the Use of Metal Chelates in Plant Nutrition (National Press, Kalifornien 1956).

² I. STEWART, Ann. Rev. Plant Physiology 14, 295 (1963).

³ L. O. TIFFIN und J. C. BROWN, Plant Physiology 36, 710 (1961).

⁴ J. N. SIMONS, R. SWIDLER und H. M. BENEDICT, Plant Physiology 37, 460 (1962).

⁵ H. BICKEL, E. GÄUMANN, W. KELLER-SCHIERLEIN, V. PRELOG, E. VISCHER, A. WETTSTEIN und H. ZÄHNER, Exper. 16, 129 (1960).

⁶ Herrn P.-D. Dr. H. ZÄHNER, Institut für spezielle Botanik, ETH, danken wir für FOB-Gaben.

⁷ H. ZÄHNER, R. HUTTER und E. BACHMANN, Arch. Mikrobiol. 36, 325 (1960).

tionssonde mit Lochkristall (Philips PW 4119) ausgezählt. Dann wurden die Proben mit 0,5 ml Äthanol (80%) versetzt und zerrieben. Im abgetrennten Extrakt wurde das FOB bestimmt.

Aus den Resultaten der Tabelle I ist ersichtlich, dass FOB von eisenhungrigen Pflanzen rasch aufgenommen wird, dass die Eisenaufnahme mit der FOB-Aufnahme korreliert und dass das komplexierte Eisen (Fe^{+3} -FOB) im Vergleich zum freien ionischen Eisen rascher in die oberirdischen Teile transportiert wird bei gleichen Ausgangskonzentrationen (5,8 μg Eisen pro ml).

Die stimulierende Wirkung von FOB auf die Eisenaufnahme konnte in einer zweiten Versuchsanordnung, wo anstatt Hoagland-Lösung nur destilliertes Wasser verwendet wurde, eindeutiger gezeigt werden, weil Ausfällen des freien Eisenions nicht in Betracht zu ziehen ist. Wie die Resultate der Tabelle II zeigen, wird auch unter diesen Bedingungen der Eisenkomplex rascher als das freie Eisenion in die oberirdischen Pflanzenteile transportiert. Ausgangskonzentration des Eisens: 11,6 μg pro ml.

Die Ursache der stimulierenden Wirkung von FOB auf die Eisenaufnahme unter den Bedingungen des zweiten Experimentes ist nicht bekannt. Gewisse Versuchsergebnisse (unveröffentlicht) deuten darauf hin, dass Eisen aus der FeCl_3 -Lösung rasch an oder in die Wurzel sorbiert wird, aber langsamer an die oberirdischen Teile abgegeben wird.

Summary. Ferrioxamin B (FOB), an iron chelating cyclopeptide, is shown to be absorbed and translocated in tomato plants from nutrient solution. Chelated iron (FOB) is transported to the upper parts of tomato plants more rapidly than ionic iron (FeCl_3).

E. STUTZ

Eidgenössische Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Wädenswil (Schweiz), 25. März 1964.

Fate of Cartilage Cells in Limb Regeneration in the Axolotl (*Ambystoma mexicanum*)

Limb regeneration in Amphibia involves a morphological de-differentiation of tissue cells to form a blastema, which subsequently develops into a complete new limb. The de-differentiation leading to blastema formation appears to be complete, so far as can be determined from electron microscopical and other observations (see review by HAY¹). Thus, highly specialized cells, such as those of cartilage and muscle, lose their characteristic morphology and become indistinguishable from each other in the blastema. For this reason their eventual fates have remained obscure, and it is not known whether they remain true to type or revert to a pluripotent state and change in type during regeneration. The present paper records an attempt to solve this problem for one cell type – that of cartilage.

Method. Our experiments involved the grafting of triploid cartilage into diploid limbs from which the distal two-thirds of the humerus had previously been removed. Host and donor larvae, 95 to 105 mm in length, were kindly provided by Dr. R. R. HUMPHREY. Both were from a dark strain of axolotls which occasionally gives triploid offspring (HUMPHREY²). Bone-free cartilage from the distal portion of the triploid humerus was placed in 1% trypsin, made up in a solution containing (in g/l): NaCl, 3.12; KCl, 0.078; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.020; NaHCO_3 , 0.389; adjusted to pH 8.0 with 0.1 N KOH. The cartilage, while in the enzyme solution, was stripped completely free of its perichondrium and then washed thoroughly in STEINBERG'S³ solution before being grafted into the host limb. After the grafts had healed in place for 5 to 7 days the host limbs were amputated at the elbow, just distal to the grafted cartilage. Regeneration was allowed to proceed for 30 or 45 days, by which time the digital cartilages were well formed. The regenerates were then fixed in Bouin's fluid, sectioned at 10 μ , and stained according to the azure B method of FLAX and HIMES⁴ – a method particularly valuable for staining nucleoli. Nucleolar number was determined in the newly formed

cartilage, muscle, and epidermis of the regenerates. Cells derived from the triploid cartilage graft would be expected to display a maximum of 3 nucleoli per nucleus, compared with a maximum of 2 nucleoli per nucleus for cells of host (diploid) origin. Both triploid and diploid cells may, of course, show fewer than the maximum nucleolar number as a result of nucleolar fusion. Thus it is only the maximum number per nucleus, exhibited in a population of cells, that can serve as a reliable indication of the ploidy of the population (FANKHAUSER and HUMPHREY⁵).

Results. 39 regenerates of diploid limbs containing grafted triploid cartilage were studied. In 28 cases the regenerates contained no triploid cartilage, and other tissues were also devoid of triploid cells. In these cases the grafts presumably failed to survive, or to be included in the amputated regenerate. The remaining 11 regenerates all showed significant numbers of cartilage nuclei with 3 nucleoli, indicating graft survival. The cartilage, muscle, and epidermis of these regenerates were examined with the following results.

In 4 cases the triploid cartilage was present in the proximal part of the amputated regenerate but was confined to the stump and failed to participate in the regeneration. The newly formed cartilage, muscle, and epidermis contained no nuclei with 3 nucleoli, so far as could be seen.

In 7 cases the grafted triploid cartilage survived and participated in regeneration, as indicated by the presence of nuclei with 3 nucleoli in the newly formed cartilage. In 3 of these cases quantitative analyses were made on rep-

¹ E. D. HAY, in *Regeneration* (ed. D. Rudnick, Ronald Press, New York 1962), p. 177.

² R. R. HUMPHREY, *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.*, in press.

³ M. STEINBERG, *Carnegie Inst. Washington Year Book* 56, 347 (1957).

⁴ M. H. FLAX and M. H. HIMES, *Physiol. Zool.* 25, 297 (1952).

⁵ G. FANKHAUSER and R. R. HUMPHREY, *Proc. U.S. Nat. Acad. Sci.* 29, 344 (1943).