

Untersuchungen über das Verhalten von Spinat und Gerste gegenüber dem herbiziden Wirkstoff Ioxynil

Von
JOSEF BERÜTER

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	214
I. Einleitung	214
II. Material und Methoden	215
1. Ioxynil, Referenzverbindungen, Hilfsstoffe und analytische Methoden.	215
2. Experimente mit Spinat- und Gerstenpflanzen	218
a) Kultivieren des Pflanzenmaterials	218
b) Bestimmung der letalen Ioxynildosis für Spinat und Gerste	218
c) Bestimmung der Aufnahme von Ioxynil durch Spinat und Gerste	219
d) Bestimmung des Einflusses von Ioxynil auf die Atmung und Phosphataufnahme von Spinatwurzeln	219
e) Gleichzeitige Bestimmung des Einflusses von Ioxynil auf die CO ₂ -Fixierung, den ³² P-Einbau in die Nukleinsäuren, die Wurzelatmung und die Phosphataufnahme an ganzen Spinatpflanzen	220
3. Experimente mit isolierten Chloroplasten	221
a) Chloroplastenherstellung	221
b) Bestimmung der Ioxynil-Hemmkonzentration I ₅₀	222
c) Bestimmung der photosynthetischen Reaktionsprodukte	222
4. Experimente über den Metabolismus von Ioxynil in Gerstenwurzeln	223
a) Papierchromatographische Charakterisierung von ¹³¹ J- und ¹⁴ C-markierten Metaboliten des Ioxynil	223
b) Nachweis des Abbaues von ¹⁴ C-markiertem Ioxynil zu ¹⁴ CO ₂	223
c) Fraktionierung ringmarkierter Abbauprodukte	223
d) Isolierung und Charakterisierung des ¹³¹ J-markierten Hauptmetaboliten 5	224
III. Resultate und Diskussion	225
1. Über das Verhalten ganzer Spinat- und Gerstenpflanzen gegenüber Ioxynil	225
2. Über die Lokalisation der Hemmstelle von Ioxynil im Photosyntheseprozess isolierter Chloroplasten	234
3. Über den Abbau von Ioxynil in Gerstenwurzeln	242
Zusammenfassung	249
Summary	249
Literatur	250

Vorwort

Herr Dir. Dr. R. FRITZSCHE ermöglichte mir die Durchführung der vorliegenden Untersuchung an der Eidg. Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil. Für seine Unterstützung danke ich ihm bestens. Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. NEUKOM von der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich für die Übernahme des Referates sowie die Betreuung und Förderung dieser Arbeit. Für die anregenden Diskussionen und Ratschläge möchte ich vor allem Herrn Dr. H.-P. BOSSHARDT sowie den Herren Dr. P. KALBERER, Prof. Dr. PH. MATILE (ETH) und Dr. A. T. TEMPERLI danken. Herrn Prof. Dr. J. LANDIS (ETH) bin ich für die Benützung des Flüssigkeits-Scintillationszählers, den Firmen Dr. R. MAAG AG, Dielsdorf (Schweiz), MAY and BAKER Ltd., Dagenham (England), und AMCHEM PRODUCTS Inc., Ambler, Penna. (USA), für die unentgeltliche Lieferung von radioaktivem Untersuchungsmaterial zu Dank verpflichtet. Dank gilt auch meiner Frau für die Durchführung der Schreibarbeiten und Fertigstellung der Graphiken und Fräulein V. MINDER für die Mithilfe bei den Versuchen.

I. Einleitung

Im heutigen Anbau von Kulturpflanzen sind die Herbizide zu einer wichtigen Gruppe von landwirtschaftlichen Hilfsstoffen geworden. Sie werden zur selektiven Bekämpfung von Unkräutern eingesetzt, die als unerwünschte biologische Konkurrenten das Wachstum der Erntepflanzen beeinträchtigen. Das Schicksal der applizierten Herbizide, und im weiteren Sinne dasjenige aller organischen Pestizide, die in unsere Umgebung kommen, ist Gegenstand intensiver Forschung und auch der Kontroverse geworden. Genannt seien hier die Pestizidrückstände, die auf den Erntegütern verbleiben und in Nahrungsketten gelangen können. Es liegen umfangreiche Untersuchungen vor (z. B. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, 1969), die über mögliche Nebenwirkungen von Pestizidrückständen auf andere Formen des Lebens wie Nutztiere, Lebewesen des Bodens und der Gewässer Auskunft geben.

Auch für die Gruppe der Herbizide steht die Frage des Abbaues dieser Verbindungen in der Pflanze und im Boden (KEARNEY und KAUFMANN, 1969) in engem Zusammenhang mit den verbleibenden Rückständen. Zum Verständnis der eigentlichen Phytotoxizität der Herbizide ist die Kenntnis der Wirkung auf die einzelnen Stoffwechselforgänge der Pflanze erforderlich. Neben den biochemischen Aspekten des Verhaltens eines Herbizides (MORELAND, 1967) sind für die Wirkung mikrobiologische Umwandlungen, Absorption an Bodenbestandteilen sowie Aufnahme und Translokation durch die Pflanze verantwortlich (AUDUS, 1964).

Die selektive Wirkung dieser Stoffe ist eine besonders für die praktische Anwendung bedeutsame Eigenschaft. Über die Gründe des resistenten Verhaltens gewisser Pflanzenarten sowie der eigentlichen primären Wirkungsweise der Herbizide liegen relativ wenig Untersuchungen vor. Am Beispiel des herbiziden Wirkstoffes Ioxynil (3,5-Dijod-4-hydroxybenzotrinitril) wurde deshalb die vorliegende Untersuchung unter-

nommen, mit dem Ziel, ein besseres Verständnis für den herbiziden Wirkungsmechanismus unter besonderer Berücksichtigung des Resistenzphänomens zu erhalten.

An zwei Modellpflanzen der Mono- bzw. Dikotyledonen (Spinat bzw. Gerste) wurde die Herbizidaufnahme durch die Wurzeln, der Transport in die Blätter und die Fähigkeit der Pflanzen den aufgenommenen Wirkstoff abzubauen untersucht. In beiden Pflanzen wurde der Effekt von Ioxynil auf die Wurzelatmung und die CO₂-Fixierung isolierter Chloroplasten bestimmt. Im weiteren befassten sich Untersuchungen im Sinne der Abklärung der primären Hemmstelle mit dem Einfluss von Ioxynil auf einzelne Stoffwechselfvorgänge (Nukleinsäuremetabolismus, Photosynthese, Wurzelatmung und Phosphataufnahme) in ganzen Spinatpflanzen.

Auf subzellulärem Niveau wurden an isolierten Chloroplasten Versuche zur Lokalisation der Hemmstelle von Ioxynil in der photosynthetischen Reaktionskette durchgeführt.

Schliesslich wurde auf molekularem Niveau der Abbau des Wirkstoffes in Gerstenwurzeln näher betrachtet.

II. Material und Methoden

1. Ioxynil, Referenzverbindungen, Hilfsstoffe und analytische Methoden

K-Salz von 3,5-Dijod-4-hydroxybenzonnitril. Ioxynil (technisches Rohprodukt) wurde von der Firma Dr. R. MAAG AG, Diesdorf zur Verfügung gestellt. Die Verbindung wurde nach CARPENTER et al. (1964) in das K-Salz übergeführt, und durch dreimalige Umkristallisation aus Aceton gereinigt.

Dünnschichtchromatogramm (Fließmittel E): Rf 0,45

C₇H₂J₂KO Ber. 62,05% J Gef. 62,15% J

¹⁴C-(ul)-ringmarkiertes und ¹⁴C≡N-Ioxynil. Die Firma AMCHEM. PRODUCTS Inc., Ambler, Penna. USA lieferte 90 mg (0,26 mCi) ringmarkiertes und die Firma MAY and BAKER Ltd., Dagenham, England 30 mg (0,20 mCi) ¹⁴C≡N-Ioxynil. Beide Produkte wurden mit dem Fließmittel E präparativ dünnschichtchromatographisch gereinigt.

¹³¹J-Ioxynil und ¹³¹J-3-Jod-4-hydroxybenzonnitril. Die beiden jodmarkierten Verbindungen liessen sich im gleichen Arbeitsgang nach einer modifizierten Methode von BERG und NEWBERY (1949) durch Jodieren von 4-Hydroxybenzonnitril herstellen.

100 mg (0,84 mMol) 4-Hydroxybenzonnitril (Aldrich) gelöst in 2,5 ml Alkohol und 6 ml Wasser wurden zusammen mit 10 mg (0,06 mMol) Jodsäure, 200 mg (1,58 mMol) Jod und 4 mCi Jod-131 (NaJ gelöst in 0,1 n NaOH: Eidg. Institut für Reaktorforschung, Würenlingen) 2 Std. auf dem Ölbad rückflusiert. Das überschüssige Jod wurde mit Natriumbisulfit entfernt und das Reaktionsgemisch auf 20°C abgekühlt. Der gebildete kristalline Niederschlag ergab nach Filtration und zweimaliger Umkristallisation aus 6 ml Alkohol/Wasser (1 : 1) 49 mg (15,7%) Smp. 202–204°C (Lit.:

205–206°C) 3,5-Dijod-4-hydroxybenzonnitril. Aus der Mutterlauge konnte durch Einengen auf 1 ml, Filtrieren des ausgefallenen Produktes und zweimalige Umkristallisation aus Wasser 8,5 mg (4,1%) Smp. 142–144°C (Lit.: 144°C) 3-Jod-4-hydroxybenzonnitril gewonnen werden. Die Smp. sowie die Jodanalysen stammen aus unmarkierten Produkten, die zur Abklärung der Arbeitsweise vor der radioaktiven Synthese hergestellt wurden.

$C_7H_3J_2NO$	Ber. 70,19% J	Gef. 69,10% J
C_7H_4JNO	Ber. 51,84% J	Gef. 51,86% J

Spezifische Aktivität (GMC):

3,5-Dijod-4-hydroxybenzonnitril:	$1,86 \cdot 10^9$ cpm/mMol
3-Jod-4-hydroxybenzonnitril:	$1,28 \cdot 10^9$ cpm/mMol

Radioaktive K-Salz-Stammlösungen. Sämtliche ^{14}C - und ^{131}J -markierten Verbindungen wurden in Alkohol (10 mg/ml) gelöst und bei $-30^\circ C$ aufbewahrt. Zur Herstellung der K-Salze wurde ein aliquoter Teil nach dem Entfernen des Alkohols in einer äquivalenten Menge Kalilauge gelöst, was die in den Experimenten verwendeten Stammlösungen von der Endkonzentration 1 mg/ml ergab. Die papierchromatographische Prüfung der einzelnen Stammlösungen bestätigte im Autoradiogramm (Abb. 1) die radioaktive Reinheit der Verbindungen.



Abb. 1. Radioautogramm (Fließmittel B) der radioaktiven Stammlösungen.

1 ringmarkiertes Ioxynil, 2 $^{14}C \equiv N$ -Ioxynil, 3 ^{131}J -Ioxynil, 4 ^{131}J -3-Jod-4-hydroxybenzonnitril.

+ + + +

3,5-Dijod-4-hydroxybenzamid. Die Verbindung liess sich nach CARPENTER et al. (1964) durch Verseifen von 3,5-Dijod-4-hydroxybenzonnitril mit 0,003 M Natronlauge (Reaktionstemp. $50^\circ C$; Reaktionsdauer 24 Std.) herstellen. Smp. $237^\circ C$ (Zers.)

$C_7H_5J_2NO_2$	Ber. 65,28% J	Gef. 64,86% J
-----------------	---------------	---------------

2,6-Dijodphenol. Jodieren von Natriumphenolat nach SCHALL (1883) in Schwefelkohlenstoff lieferte neben zwei weiteren jodierten Derivaten das 2,6-Dijodphenol. Smp. $67^\circ C$ (Lit.: $68^\circ C$)

$C_6H_4J_2O$	Ber. 73,39% J	Gef. 69,13% J
--------------	---------------	---------------

2,6-Dijodchinon, 2,6-Dijodhydrochinon. Ausgehend von 4-Nitrophenol wurde nach BLOCK und POWELL (1942) das 2,6-Dijod-4-nitrophenol hergestellt. Die Nitroverbindung konnte nach SEIFERT (1883) mit Zinn-(II)-chlorid zum entsprechen-

den Amin reduziert und anschliessend mit Kaliumbichromat zum 2,6-Dijodchinon Smp. 179–181°C (Lit.: 177–179°C) oxydiert werden. Reduktion des 2,6-Dijodchinons mit Zinn(II)-chlorid ergab 2,6-Dijodhydrochinon. Smp. 142–144°C (Lit.: 144–145°C)

$C_6H_2J_2O_2$ Ber. 70,54% J Gef. 69,99% J
 $C_6H_4J_2O_2$ Ber. 70,19% J Gef. 69,10% J

Hilfsstoffe und Enzympräparate. Ferredoxin wurde nach der Methode von TAGAWA und ARNON (1964) aus Spinatblättern isoliert.

Die folgenden Präparate wurden von Calbiochem, Los Angeles, Calif. USA bezogen: 1- ^{14}C -L-Leucin (Spez. Akt. 15–30 mCi/mMol), Adenosin-5'-diphosphat (ADP), Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADP) und dessen reduzierte Form (NADPH₂), Ribose-5-phosphat, Pyruvat-kinase (178 EU/mg), 2-Phosphorenylpyruvat, Methylphenazoniummethosulfat (PMS), 2,6-Dichlorphenol-indophenol (DPIP) N-Tris-(hydroxymethyl)methylglycin (Tricin), N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure (HEPES), Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris).

Chromatographische Methoden. Präparative Reinigung von Substanzen (ca. 100 mg) wurden auf 2 mm Dünnschichtplatten (20×20 cm) durchgeführt, die mit Silicagel PF (Merck Darmstadt) beschichtet waren. Nach der Chromatographie liess sich aus dem abgekratzten Silicagel die Verbindung mit Alkohol eluieren.

Zum Auftrennen analytischer Mengen dienten DC-Fertigplatten Kieselgel F 254 (Merck) mit der Schichtdicke 0,25 mm.

Für die papierchromatographischen Untersuchungen wurde das Papier Nr. 2043 B mgl (30×30 cm) von Schleicher und Schuell (Feldmeilen) verwendet. Es wurde aufsteigend mit den folgenden Fließmitteln (v/v) chromatographiert:

A: sec.-Butanol/Alkohol/Ammoniak (25%)/Wasser	= 100 : 25 : 7 : 28
B: n-Butanol/Essigsäure/Wasser	= 4 : 1 : 2,2
C: Chloroform	
D: Chloroform/Alkohol	= 95 : 5
E: Toluol/Aceton	= 2 : 3

Zur Sichtbarmachung chromatographierter radioaktiver Verbindungen wurden die Chromatogramme 4–8 Wochen auf Röntgenfilmen Ferrania (radio Simplex 2) exponiert und anschliessend photographisch entwickelt.

Radioaktivitätsmessungen. Für die Bestimmung der Radioaktivität gelangten zwei verschiedene Methoden zur Anwendung. Im einen Fall wurden die Proben auf Aluminiumplanchetten unter einer Infrarotheizquelle eingetrocknet und mit einem Geiger-Müller-Zähler (GMC) der Firma Philips, Eindhoven (Niederlande) gezählt. Im anderen Fall wurden zur ^{14}C -Bestimmung nach dem Flüssigkeitsszintillationsverfahren die Proben nach KALBERER und RUTSCHMANN (1961) verbrannt, und das gebildete $^{14}CO_2$ mit 10 ml Absorptionslösung (120 ml Äthanolamin/1000 ml. abs. Methanol) absorbiert. 5 ml dieser Lösung wurden in Zählgläschen mit 5 ml Scintillationslösung bestehend aus 0,4% BBOT (Ciba, Basel) und 0,01% POPOP (1,4-Bis-(5-phenyl-2-oxazolyl)-benzol) in reinem Toluol gemischt und in einem Tri Carb Liquid Scintillation Counter der Firma Packard und Co., La Grange, Illinois,

gezählt. Das Quenching liess sich durch vergleichende Messungen einer Reihe gleicher toluollöslicher Radioaktivitätsproben mit und ohne Verbrennen ermitteln.

Warburgtechnik. Physiologische Gasanalysen und photosynthetische Reaktionen wurden mit Hilfe des Gilson-Respirometers Typ GR P14 durchgeführt. Als Reaktionsgefässe dienten folgende zwei Typen der Firma Braun, Melsungen: 20 ml-Gefäss mit einem Seitenarm und zentralem Einsatzgefäss, 21 ml-Gefäss mit einem Seitenarm und wannenförmig zentralem Einsatzgefäss, das mit einem weiteren Seitenarm verbunden war.

Jodbestimmung. Jod in organischen Verbindungen wurde nach einer von SEGAL und SUTHERLAND (1967) beschriebenen Methode durch Verbrennen der Analysesubstanz in der Wurzschmitt-Bombe und anschliessender argentometrischer Titration bestimmt.

2. Experimente mit Spinat- und Gerstenpflanzen

a) Kultivieren des Pflanzenmaterials. Spinatsamen (*Spinacia oleracea* L., Sorte Vital R) wurden in Glasschalen auf einem sterilen Gemisch bestehend aus 1 Teil Torf und 3 Teilen Kompost ausgesät. Nach 5–7 Tagen konnten die Keimlinge auf Wasserkulturen gebracht werden, wo sie auf synthetischer Nährlösung (HOAGLAND und ARNON, 1950) weiter kultiviert wurden. Als Kultivationsgefässe dienten rechteckige Glasschalen mit einem Inhalt von 2 Liter (Länge 19 cm, Breite 11 cm, Höhe 11 cm), deren Aussenseite gegen Lichtzutritt mit Aluminium-Folie umwickelt waren. Der Deckel bestand aus einer 0,3 cm dicken Plexiglasscheibe, die ebenfalls mit Aluminium-Folie überzogen war. Auf diesem wurden die Pflanzenkeimlinge mit Hilfe eines Wappropfens in Löcher von 1 cm Durchmesser befestigt. Der Pflanzenabstand betrug ca. 7 cm.

Grössere Spinatmengen, deren Blätter zur Isolierung der Chloroplasten dienen, wurden analog in 25 Liter PVC-Behältern (Länge 36,5 cm, Breite 55 cm, Höhe 12,7 cm) gezogen.

Die Kultivation wurde in einem Gewächshaus durchgeführt. Die Temperatur betrug in der Nacht 15°C und am Tag 20°C. Während einer Belichtungsdauer von 8 Std. pro 24 Std. waren die Pflanzen unter den verwendeten Lichtquellen (Leuchtröhren Philips TLF 20 W/33) einer Lichtintensität von 2500 Lux ausgesetzt.

Zur Züchtung von Gerstenkulturen (*Hordeum vulgare* L., Sorte Wintergerste Astrid) galten, bis auf die folgenden Unterschiede, analoge Bedingungen wie für Spinat: Die Gerstenkörner wurden vor der Aussaat über Nacht in Brunnenwasserquellen gelassen. Auf der Wasserkultur betrug der Pflanzenabstand ca. 2,5 cm.

Unter den beschriebenen Bedingungen bildete der Spinat in 7 Wochen je 6–7 Blätter pro Pflanze, während die Gerstenpflanzen in 3 Wochen das Dreiblattstadium erreichten. Wenn nicht anders erwähnt, wurden in den Experimenten Pflanzenkulturen von diesem Wachstumsstand verwendet.

b) Bestimmung der letalen Ioxynildosis für Spinat und Gerste. 6 Spinat- bzw. Gerstenkulturen mit je 3 bzw. 5 Pflanzen wurden auf frische Nährlösung (2 Liter) gebracht, die in steigender Konzentration Ioxynil (K-Salz) enthielten. Die applizierten Inkubationskonzentrationen des Herbizides betrug (in 10^{-6} M):

für Spinat 0; 0,12; 0,25; 0,49; 1,2; 2,5 und für Gerste 0; 2,5; 6,1; 12,2; 18,4; 24,5. Das weitere Verhalten der Pflanzen wurde bei unveränderten Umweltsbedingungen während 14 Tagen beobachtet. Als Mass für die Herbizid-Empfindlichkeit diente der allgemeine Zustand der Pflanzen (Chlorose, Welken, dürre Blätter usw.). Durch Vergleichen der Grösse, der von den verschiedenen Ioxynilkonzentrationen erzeugten phytotoxischen Schäden an Spinat und Gerste, konnte die letale sowie die von der Pflanze verträgliche Dosis ermittelt werden.

c) Bestimmung der Aufnahme von Ioxynil durch Spinat und Gerste. Je eine Spinat- bzw. Gerstenkultur mit 6 bzw. 30 Pflanzen wurden auf frische Nährlösung (2 Liter) gebracht. Beide Zuchten wurden über die Kulturlösung bei Dauerbelichtung (2500 Lux) und der Temperatur 20°C mit $4,9 \cdot 10^{-6}$ M ringmarkiertem Ioxynil (K-Salz) inkubiert. Nach 2, 6, 12, 24, 36 und 50 Std. wurden je eine Spinat- und 5 Gerstenpflanzen geerntet und in Wurzeln und Grünteile zerlegt. Die Wurzeln wurden 5mal mit je 50 ml Nährlösung, die $4,9 \cdot 10^{-6}$ M unmarkiertes Ioxynil enthielt, gewaschen.

Zur Extraktion kochte man das in ca. 1 cm lange Stücke geschnittene Pflanzenmaterial 15 min. mit 20–30 ml 80% igem Alkohol, filtrierte durch eine G3-Nutsche, und vervollständigte die Extraktion des Rückstandes im Soxleth während 4 Std. mit 50 ml abs. Alkohol. Die vereinigten Wurzelextrakte wurden unter Stickstoff am Rotationsverdampfer bei 40°C auf 2 ml und die Blätterextrakte auf 5 ml eingeeengt. Die Pflanzenrückstände wurden 4 Tage bei Zimmertemperatur getrocknet und gewogen. Die Radioaktivitätsbestimmung geschah durch Verbrennen aliquoter Anteile (0,4 ml für Extrakte, 10 mg für Wurzelrückstände) nach KALBERER und RUTSCHMANN (1961). Das von den Pflanzen aufgenommene Herbizid wurde als cpm/mg trockenes Pflanzenmaterial berechnet.

Zur chromatographischen Untersuchung wurden je 100 μ l der Extrakte mit dem Fliessmittel A auf Papier aufgetrennt, die anschliessend auf Röntgenfilme kopiert wurden.

Die prozentuale Bestimmung einzelner im Autoradiogramm sichtbarer Verbindungen erfolgte durch Ausschneiden der betreffenden Flecken vom Papierchromatogramm, Messen der ^{14}C -Aktivität nach dem Verbrennen und deren Berechnung auf die Gesamtimpulsrate der Extrakte.

d) Bestimmung des Einflusses von Ioxynil auf die Atmung und Phosphataufnahme von Spinatwurzeln. Die Wurzeln von 8–10 Wochen auf Wasserkulturen gezogenen Pflanzen wurden geerntet und in ca. 2 cm lange Stücke geschnitten. Ca. 70 mg eines guten Durchschnittsmusters der ganzen Wurzeln wurden in Warburgtröge gebracht, die in einem Endvolumen von 3,0 ml neben Ioxynil (K-Salz) in variabler Konzentration, das Inkubationsmedium mit den, der Nährlösung analogen, folgenden Komponenten enthielten:

in μ Mol: KH_2PO_4 3; KNO_3 15; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 15; MgSO_4 6; Seitenarm: $\text{NaH}^{32}\text{PO}_4$ 19 (10 μ Ci).

in m μ Mol: H_3BO_3 150; MnCl_2 30; ZnSO_4 2; CuSO_4 0,9; H_2MoO_4 0,03; Fe-Komplexon 15.

Der pH betrug 6,6. Das Zentrum der Warburggefässe enthielt zur Absorption des CO_2 0,2 ml 2 n Kalilauge und einen Filterpapierstreifen. In jedem Experiment wurden zwei herbizidfreie Kontrollproben mitgeführt. Nach einer Vorinkubations-

zeit von 10 min wurde das $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ (Eidg. Institut für Reaktorforschung, Würenlingen) zugegeben und im Respirometer bei 20°C der Sauerstoffverbrauch manometrisch während 1 Std. gemessen. Anschliessend wurden die Wurzelproben 5 mal mit je 50 ml eisgekühltem unmarkiertem Inkubationsmedium gewaschen und auf Filterpapier gebracht, das auf einer eisgekühlten Alu-Folie lag.

Die $\text{HClO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_4$ -löslichen Phosphate in den Wurzeln wurden nach HAGIHARA und LARDY (1960) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Proben bei 0°C in einem Teflon Homogenisator mit 1,5 ml einer Lösung bestehend aus 0,9 M HClO_4 und 0,6 M Na_2SO_4 zerkleinert. Das Homogenat wurde zusammen mit 1,5 ml des Molybdatreagens (bestehend aus 12,5 ml 4% $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,3 ml n-Hexanol, 10 ml abs. Methanol und 2,2 ml dest. Wasser) in ein 3,5 ml-Zentrifugenglas gegeben, geschüttelt und mit 0,1 ml Bromwasser versetzt. Nach erneutem Schütteln wurde 5 min bei 20 000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde bei 100°C 24 Std. getrocknet und gewogen. 1,0 ml des Überstandes wurde mit 4,0 ml dest. Wasser in einem Zählgläschen gemischt und diente zur Bestimmung des extrahierten Gesamtphosphorgehaltes.

Zur Abtrennung des anorganischen Phosphormolybdatkomplexes chromatographierte man den restlichen Überstand durch silikonisiertes Celite, das vorher mit n-Hexanol equilibriert wurde. 1,0 ml des Eluates, vermischt mit 4,0 ml Wasser, diente zur Bestimmung des löslichen organischen Phosphates. Die Radioaktivität der Proben für das gesamte und das organische Phosphat wurde nach CLAUSEN (1968) in einem Liquid Scintillation Counter unter Tritiumbedingungen gemessen.

Die erhaltenen Werte für das extrahierte Phosphat liessen sich als cpm/mg Wurzeln (Trockengewicht) und für den gebrauchten Atmungssauerstoff als $\mu\text{l O}_2/\text{mg}$ Wurzeln (Trockengewicht) berechnen. Die Werte für den anorganischen Phosphatgehalt ergaben sich als Differenz zwischen dem gesamten und dem organischen Anteil. Sämtliche Werte wurden als % auf die herbizidfreie Probe bezogen.

e) Gleichzeitige Bestimmung des Einflusses von Ioxynil auf die CO_2 -Fixierung, den ^{32}P -Einbau in die Nukleinsäuren, die Wurzelatmung und die Phosphataufnahme an ganzen Spinatpflanzen. 4 Spinatkulturen mit je 7 Pflanzen wurden auf 650 ml frische Nährlösung (Gefässe: Durchmesser 18 cm, Höhe 5 cm) gebracht, welche die folgenden zusätzlichen Komponenten enthielten:

Kultur	Ioxynil (K-Salz)	$\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$	
I	$4,9 \cdot 10^{-6}$ M	1 mCi	} Versuchsserie
II	$4,9 \cdot 10^{-6}$ M	—	
III	—	1 mCi	} Kontrollserie
IV	—	—	

Bei Dauerbelichtung (2500 Lux) und einer Gewächshaustemperatur von 20°C wurden nach bestimmten Zeitpunkten (2–50 Std.) Pflanzenproben von der Versuchs- und der Kontrollserie geerntet und auf die Aktivitäten der folgenden Stoffwechselfvorgänge untersucht: In den Blättern wurde die CO_2 -Fixierung und der ^{32}P -Einbau in die Nukleinsäuren, in den Wurzeln die Atmung und Phosphataufnahme bestimmt.

Zu jedem Zeitpunkt wurden die Stoffwechselraten der Ioxynil-behandelten Pflanzen berechnet und in % der herbizidfreien Kontrollproben ausgedrückt.

CO₂-Fixierung in den Blättern. Die Raten der CO₂-Assimilation der Spinatblätter aus der Ioxynil-behandelten Kultur II sowie der Kontrolle IV wurde an Blattausstichen mit der Warburgtechnik nach KALBERER et al. (1967) mit der ¹⁴CO₂-Methode ermittelt.

Einbau von ³²P in die Nukleinsäuren der Blätter. Die Aktivität des ³²P-Einbaues liess sich durch Bestimmen der extrahierten markierten Nukleinsäuren aus den Blättern der Kulturen I und III bestimmen. Für die Extraktion der Nukleinsäuren diente eine modifizierte Methode von SCHNEIDER (1945). Ca. 3,0 g Blätter (4 Stück) wurden in 15 ml Methanol 1 min im Sorvall-Omnimixer homogenisiert, 3 min bei 15 000 g zentrifugiert und das Sediment ein zweites Mal analog behandelt. Der Rückstand wurde weiter 1 min in 15 ml Alkohol aufgerührt und 3 min bei 15 000 g zentrifugiert. Dann folgten 2 Extraktionen mit 15 ml Äther/Alkohol 1:3 bei 40°C, wobei jedes Mal 1 min gerührt und nachfolgend 5 min bei 30 000 g zentrifugiert wurde. Das Sediment wurde kurz in 15 ml 5% TCE (Trichloressigsäure) bei 0°C suspendiert und 5 min bei 30 000 g zentrifugiert. Schliesslich wurden die Nukleinsäuren während 20 min mit 15 ml 5% TCE bei 95°C unter Rühren extrahiert. Die Suspension wurde durch 5-minütige Zentrifugation (bei 30 000 g) getrennt und der Überstand durch einen Faltenfilter in ein Zählgläschen filtriert. Die Radioaktivität der markierten Nukleinsäuren konnte im Liquid Scintillation Counter bei Tritiumbedingungen nach CLAUSEN (1968) gemessen werden.

Vor der weiteren analytischen Untersuchung der Nukleinsäureextrakte liess sich die TCE durch 4maliges Ausschütteln mit je 20 ml wassergesättigtem n-Butylacetat nach YOUNG (1964) entfernen. In der wässrigen Phase wurde der Phosphor nach KING (1932) bestimmt. Die Nukleinsäuren wurden spektrophotometrisch durch Messen der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Als Standard diente Kalb-Thymus-DNS. Die erhaltenen Werte wurden als cpm/mg Nukleinsäure bzw. cpm/μAtom Phosphor berechnet.

Atmung und Phosphataufnahme durch die Wurzeln. Die Aktivität der Atmung und der Phosphataufnahme sowie der Bildung des HClO₄/Na₂SO₄-löslichen organischen Phosphates wurde mit isolierten Wurzeln der Kulturen I und III nach der unter 2 (d) beschriebenen Methode bestimmt.

3. Experimente mit isolierten Chloroplasten

a) Chloroplastenherstellung. Als Versuchsmaterial dienten Blätter von 8–11 Wochen alten Spinat- bzw. 4–6 Wochen alten Gerstenpflanzen, die wie unter 2 (a) beschrieben auf Wasserkulturen gezogen wurden. Wo nichts weiteres vermerkt wird, stammten die isolierten Chloroplasten aus folgender Präparationsmethode (ARNON et al., 1954).

Ca. 5 g frisch geerntete Blätter wurden mit 35 ml eiskühlem Präparationsmedium (0,35 M NaCl, 0,2 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6) während 10 sec bei 8200 upm im Sorvall-Omnimixer zerkleinert. Das Homogenat wurde durch eine 6fache Nylon-

gewebeschild (Riwosa AG, Zürich) mit der Maschenöffnung 50 Mikron filtriert. Das Filtrat wurde 1 min bei 2500 g und 0°C zentrifugiert. Die sedimentierten Chloroplasten konnten in 10 ml einer Lösung bestehend aus 0,05 M NaCl und 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6 mit einem Watte-umwickelten Glasstab suspendiert werden. Die ganze Präparation geschah in einem Eisbad unter Dämmerlicht.

Der Chlorophyllgehalt der Chloroplastensuspension wurde nach ARNON (1949) bestimmt.

Für die Bestimmung der CO₂-Fixierung nach TREBST et al. (1958) wurden osmotisch gebrochene Chloroplasten benötigt. Zu diesem Zweck suspendierte man die aus der beschriebenen Präparationsmethode stammenden Chloroplasten in einer Lösung bestehend aus 0,02 M NaCl und 0,01 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,5. Der benötigte Chloroplastenextrakt wurde durch 10minütiges Suspendieren frisch isolierter Chloroplasten in 7 ml dest. Wasser bei 0°C, und Zentrifugieren bei 20 000 g erhalten.

Ganze (osmotisch intakte) Chloroplasten, wie sie für die CO₂-Fixierung nach KALBERER et al. (1967) und für den Leucin-Einbau erforderlich sind, wurden mit dem Präparationsmedium isoliert, das die Komponenten 0,35 M Sorbit, 0,025 M HEPES-KOH-Puffer pH 7,6, 0,002 M EDTA pH 7,6 und 0,002 M Isoascorbat enthielt.

b) Bestimmung der Ioxynil-Hemmkonzentration I₅₀. Zur Bestimmung des Einflusses von Ioxynil auf die photosynthetischen Reaktionen isolierter Chloroplasten gelangte die Warburgtechnik zur Anwendung. Die Chloroplastensuspension wurde zusammen mit den erforderlichen Cofaktoren in die Warburggefäße pipettiert. Die Reaktionsgemische enthielten Ioxynil (K-Salz) in steigender Konzentration. Jede Versuchsreihe wies eine herbizidfreie Probe sowie eine Dunkelprobe auf. Die photosynthetische Reaktion wurde bei 20°C im Photorespirometer durch Belichten der Proben mit ca. 10 000 Lux gemessen.

Nach der Bestimmung der Photosyntheseprodukte wurden diese als % der herbizidfreien Kontrollprobe berechnet. Aus der resultierenden Hemmkurve liess sich die Ioxynilkonzentration (I₅₀) ermitteln, die eine 50%ige Hemmung der gemessenen Reaktion ergab. Die Raten der Kontrollproben wurden als μ Mol Reaktionsprodukt/mg Chlorophyll · Std. berechnet.

c) Bestimmung der photosynthetischen Reaktionsprodukte. Der in den Hillreaktionen entwickelte Sauerstoff wurde manometrisch bestimmt.

Zur Messung des NADPH₂ wurden die Reaktionsgemische 10 min bei 0°C und 18 000 g zentrifugiert. Vom Überstand verdünnte man 0,2 ml mit dest. Wasser auf 3,0 ml und mass bei 340 nm.

Das gebildete, radioaktiv markierte ATP konnte in den Reaktionsgemischen nach der Methode von HAGIHARA und LARDY (1960), wie unter 2 (d) für Wurzeln beschrieben, bestimmt werden.

Zur Bestimmung des photosynthetisch fixierten ¹⁴CO₂ wurde die Reaktion in den Warburggefässen durch Zugabe von 0,2 ml 1 n Salzsäure aus dem Seitenarm gestoppt. 0,5 ml der Reaktionsgemische wurden auf Aluminiumplanchetten eingetrocknet und die Radioaktivität mit dem GMC bestimmt.

Der ¹⁴C-Leucin-Einbau in die Proteine der Chloroplasten liess sich nach der Methode von RAMÍREZ et al. (1968) bestimmen.

4. Experimente über den Metabolismus von Ioxynil in Gerstenwurzeln

a) Papierchromatographische Charakterisierung von ^{131}J - und ^{14}C -markierten Metaboliten des Ioxynil. 4 Gerstenkulturen mit je 15 Pflanzen wurden in Glasschalen (Länge 20 cm, Breite 10 cm, Höhe 5 cm) auf 600 ml frische Nährlösung gebracht, die folgende radioaktive Komponenten enthielten:

Kultur	Konzentration (M)	Verbindung
I	$4,9 \cdot 10^{-6}$	^{14}C -ringmarkiertes Ioxynil
II	$4,9 \cdot 10^{-6}$	$^{14}\text{C} \equiv \text{N}$ -Ioxynil
III	$4,9 \cdot 10^{-6}$	^{131}J -Ioxynil
IV	$7,0 \cdot 10^{-6}$	^{131}J -3-Jod-4-hydroxybenzonnitril

Nach einer Inkubationszeit von 90 Std. im Gewächshaus wurden die Wurzeln geerntet, 5mal mit je 100 ml inaktiver Nährlösung gewaschen, und mit 80% igem Alkohol, wie unter 2 (c) beschrieben, extrahiert (Endvol.: 10 ml). Die ^{14}C -Aktivität der Extrakte I und II liess sich nach KALBERER und RUTSCHMANN (1961) und die ^{131}J -Aktivität der Extrakte III und IV auf Aluminiumplanchetten mit dem GMC bestimmen.

Je 100 μl der Extrakte I bis IV wurden separat und je 50 μl im Gemisch auf Papier mit den Fließmitteln A und B zweidimensional chromatographiert. Zum Sichtbarmachen der radioaktiven Flecken wurden die getrockneten Chromatogramme auf Röntgenfilme kopiert.

Zur papierchromatographischen Identifikation vermuteter Metaboliten wurden 100 μl des Extraktes I bzw. III mit 20 μg der folgenden Verbindungen cochromatographiert: Ioxynil, 3-Jod-4-hydroxybenzonnitril, 3,5-Dijod-4-hydroxybenzamid, 3,5-Dijod-4-hydroxybenzoesäure, 2,6-Dijodphenol, Arbutin (Fluka, Buchs) und Kaliumjodid. Nach dem Herstellen der Radioautographien konnten die Jodverbindungen nach BOWDEN und MACLAGAN (1954) durch Aufpressen eines mit dem Nachweisreagens (10% $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$: 5% $\text{Na}_2\text{AsO}_3 = 1:1$) imprägnierten Filterpapiers auf die Chromatogramme als weisse Flecken auf gelbem Grund sichtbar gemacht werden. Arbutin ergab nach dem Besprühen mit 1% KMnO_4 eine grüne Reaktion.

Für die Bestimmung der ^{14}C -Verteilung der im Autoradiogramm sichtbaren Flecken wurden die unter 2 (c) beschriebene Methode verwendet.

b) Nachweis des Abbaues von ^{14}C -markiertem Ioxynil zu $^{14}\text{CO}_2$. 2 Gerstenkulturen mit je 15 Pflanzen wurden auf je 600 ml frische Nährlösung gebracht, die $4,9 \cdot 10^{-6}$ M ringmarkiertes bzw. $^{14}\text{C} \equiv \text{N}$ -markiertes Ioxynil enthielten. 3 Tage nach der Herbizidzugabe kamen die Pflanzen unter separate Glasglocken, durch die während 24 Std. ein schwacher CO_2 -freier Luftstrom gesogen wurde (Vorschalten von 1 Waschflasche mit 150 ml 1 n NaOH). Die austretende Luft wurde zur Absorption des $^{14}\text{CO}_2$ durch 2mal 100 ml 1 n Natronlauge geleitet. Zur Radioaktivitätsmessung wurde aus 5 ml Absorptionslösung das $^{14}\text{CO}_2$ in einem geschlossenen System mit 2 ml 10 n Schwefelsäure ausgetrieben und in 5 ml Äthanolamin/Methanol 12:88 absorbiert. In dieser Lösung konnte nach Zugabe des Scintillators die Radioaktivität bestimmt werden.

c) Fraktionierung ringmarkierter Abbauprodukte. 30 Gerstenpflanzen wurden 12 Tage lang auf 600 ml Nährlösung mit $14,2 \cdot 10^{-6}$ M ringmarkiertem

Ioxynil inkubiert. Nach der Ernte wurden die Wurzeln 4mal mit je 100 ml inaktiver Nährlösung gewaschen, und zwischen Filterpapier getrocknet, was 18,0 g frisches Pflanzenmaterial ergab. Zur Extraktion zerkleinerte man die Wurzeln im Sorvall-Omnimixer während 5 min mit 50 ml 90% igem Alkohol. Das Homogenat wurde durch ein Nylontuch filtriert, und der Rückstand weitere 2mal analog mit je 40 ml Alkohol/Äther 3 : 1 (Homogenisierzeit 1 min), und 1 mal mit 40 ml Äther (Homogenisierzeit 30 sec) extrahiert.

Nach dem Filtrieren der vereinigten Auszüge durch eine G4-Nutsche wurde der Rohextrakt am Rotationsverdampfer auf 20 ml eingengt, und bei 0°C mit 1 n Natronlauge auf pH 11 gestellt. Anschliessend wurde 4mal mit je 60 ml Äther ausgeschüttelt, was den Ätherextrakt pH 11 ergab. Die Wasserphase wurde mit 1 n Salzsäure auf pH 5 gestellt und weitere 4mal mit je 60 ml Äther ausgeschüttelt, was den Ätherextrakt pH 5 lieferte. Beide Ätherauszüge wurden über Natriumsulfat getrocknet und auf 5,0 ml eingengt. Sämtliche Stufen der Extraktion wurden durch Messen der Radioaktivität nach KALBERER und RUTSCHMANN (1961) verfolgt. Je 200 μ l der Ätherextrakte sowie der restlichen Wasserphase wurden mit den Fliessmitteln A und B zweidimensional chromatographiert und die Chromatogramme auf Röntgenfilme kopiert.

d) Isolierung und Charakterisierung des ^{131}J -Hauptmetaboliten 5. 9,0 ml des Alkoholextraktes aus 4 (a), der die Jod-markierten Ioxynilmetaboliten enthielt wurden zur Entfernung des Alkohols am Rotationsverdampfer auf 2,0 ml eingengt, mit 1 n Salzsäure auf pH 5 gestellt und 4mal mit 1 ml Äther ausgeschüttelt. Die Wasserphase wurde als Streifen auf 2 Papierchromatogramme (30 \times 30 cm) aufgetragen und in Fliessmittel A aufgetrennt. Die Stelle für den Hauptmetaboliten konnte auf den Chromatogrammen zwischen den Rf-Werten 0,30 und 0,45 mit dem GMC abgetastet werden. Die lokalisierte Zone wurde ausgeschnitten und die Verbindung mit 30 ml dest. Wasser aus den Papierschnitzeln eluiert. Nach dem Einengen des Eluates auf 2,0 ml folgte eine analoge Chromatographie mit dem Fliessmittel B. Der Hauptmetabolit, der sich diesmal zwischen den Rf-Werten 0,60 und 0,75 befand, wurde im Endvolumen von 2 ml mit dest. Wasser eluiert. Die Identität und Reinheit des isolierten Hauptmetaboliten wurde durch ein Autoradiogramm mit den Fliessmitteln A und B bestätigt.

Je 0,5 ml des isolierten Hauptmetaboliten wurde in Reagenzgläsern mit 4 ml Citratpuffer pH 4,4 (0,1 M Citronensäure/0,2 M Na_2HPO_4 56 : 44) gemischt, und zusätzlich zur einen Probe 9,0 mg Emulsin (Fluka, Buchs; β -Glucosidaseaktivität 10 E/mg) zugefügt. Die Gefässe wurden bei 38°C unter Luft während 5 Std. geschüttelt. Nachdem die Proben im Eisbad abgekühlt waren, extrahierte man 3mal mit je 4 ml Äther. In den vereinigten, unter einem Stickstoffstrom auf 1 ml eingengten Ätherextrakten und in der Wasserphase wurde die Radioaktivität mit dem GMC bestimmt.

Zur Ätherphase der Emulsinspaltung wurden 100 μ g 2,6-Dijod-hydrochinon (vermutbarer Metabolit) zugegeben und auf einem Dünnschichtchromatogramm mit den Fliessmitteln C und D zweidimensional aufgetrennt. Zur Lokalisation der radioaktiven Flecken wurde das Chromatogramm auf einen Röntgenfilm kopiert, während das 2,6-Dijodhydrochinon unter UV-Licht sichtbar gemacht werden konnte.

III. Resultate und Diskussion

1. Über das Verhalten ganzer Spinat- und Gerstenpflanzen gegenüber Ioxynil

Die herbiziden Eigenschaften von 3,5-Dijod-4-hydroxybenzonnitril (Ioxynil) und dessen Bromanalogen (Bromoxynil) wurden unabhängig voneinander von WAIN (1963), CARPENTER und HEYWOOD (1963) sowie der Firma AMCHEM PRODUCTS Inc. USA (1963) entdeckt. Der Wirkstoff soll zudem molluskizide Eigenschaften besitzen (WAIN, 1963). Die fertigen Formulierungen werden hauptsächlich zur Bekämpfung von Unkräutern in Getreidekulturen verwendet. Die herbizide Wirkung richtet sich vor allem gegen dikotyle Unkräuter, während monokotyle Getreidearten sich auffallend resistent zeigen (WAIN, 1963; CARPENTER et al., 1964). Im Zusammenhang mit der unterschiedlichen phytotoxischen Wirkung von Ioxynil kann festgestellt werden, dass der Wirkstoff stärker in Blätter von weissem Senf eindringt und dort transloziert wird, als dies bei Gerste und Erbsen der Fall ist (DAVIS et al., 1968).

Versuche über den Abbau von Ioxynil in Bohnenpflanzen wie auch im Boden zeigen, dass als Metaboliten Jodid, 3,5-Dijod-4-hydroxybenzamid und die entsprechende Säure entstehen (WAIN et al., 1966; ZAKI et al., 1967). WAIN et al. (1966) konnten nachweisen, dass z. B. Bohnen sehr empfindlich, Kohl aber sehr resistent auf Natriumjodid reagieren. Dies zeigt, dass ein in der Pflanze entstehendes Abbauprodukt des herbiziden Wirkstoffes eine weitere phytotoxische Wirkung entfalten kann.

Über die eigentliche Wirkungsweise von Ioxynil auf die Stoffwechselforgänge in der Pflanze liegen verschiedene Berichte vor. Das Chlorophyll wird in belichteten Bohnenblättern in Gegenwart des Herbizides rasch zerstört (ZAKI et al., 1967). Der Wirkstoff erweist sich weiter *in vivo* als Hemmstoff für die RNS- und Proteinbiosynthese (MANN et al., 1965; MORELAND et al., 1969). In mit Ioxynil inkubierten Zuckerrübenpflanzen wird die Transpiration gleichzeitig mit der photosynthetischen Aktivität gehemmt (VAN OORSCHOT, 1970).

Weitere Arbeiten über die Wirkungsweise beziehen sich auf die Beeinflussung der Stoffwechselforgänge auf subzellulärem Niveau. An isolierten Chloroplasten wird durch Ioxynil die Hillreaktion mit Ferricyanid blockiert (KERR und WAIN, 1964). Ebenso kann die Hemmwirkung auf die NADP-Photoreduktion, die damit verbundene nicht-cyclische Phosphorylierung und die CO₂-Fixierung in Chloroplasten nachgewiesen werden (PATON und SMITH, 1965a). Aus Untersuchungen zur exakten Lokalisation der Hemmstelle im photosynthetischen Elektronentransportsystem der Chloroplasten liegen teils widersprüchliche Resultate vor (PATON und SMITH, 1965b; FRIEND und OLSSON, 1967; GROMET-ELHANAN, 1969).

An isolierten pflanzlichen Mitochondrien (KERR und WAIN, 1964; FERRARI und MORELAND, 1969) sowie an Rattenlebermitochondrien (PARKER, 1965) wird die oxydative Phosphorylierung durch Ioxynil analog dem 2,4-Dinitrophenol entkoppelt.

Auf Grund der eingangs erwähnten Untersuchungen lassen sich keine eindeutigen Aussagen über die Gründe der Resistenz monokotyler Getreidearten gegenüber Ioxynil machen. Die auf subzellulärem Niveau beobachteten Effekte auf die auto-

nomen Stoffwechselfvorgänge isolierter Chloroplasten und Mitochondrien dürften in der ganzen Pflanze nicht unbedingt den gleich empfindlichen Hemmstellen des Herbizides entsprechen. Dass die phytotoxische Wirkung nur teilweise vom Effekt auf die Chloroplasten abgeleitet werden kann, zeigen vergleichende Versuche, in denen Chloroplasten von resistenten und herbizidanfälligen Pflanzenarten gleich empfindlich reagieren (ARNDT und KÖTTER, 1968; FRANK und SWITZER, 1969; HURTER et al., 1968). Eine Abklärung der physiologischen und biochemischen Ursachen, die das resistente Verhalten bedingen, dürfte zu einem besseren Verständnis der phytotoxischen Wirkungsweise von Ioxynil beitragen.

Unterschiedliche Empfindlichkeit von Spinat und Gerste gegenüber Ioxynil. Wie bereits erwähnt, verhalten sich monokotyle Getreidearten wesentlich resistenter gegenüber Ioxynil als dikotyle Unkräuter. Bei diesem Verhalten kann es sich um eine scheinbare Resistenz handeln, die durch die Morphologie der Pflanzen oder durch Applikationsbedingungen und Absorption des Herbizides von Bodenbestandteilen bedingt wird. Um diese Faktoren auszuschalten, wurde das Verhalten von Spinat und Gerste als typische Vertreter der Mono- bzw. Dikotyledonen, auf Wasserkulturen überprüft. Aus Abb. 2 ist ersichtlich, dass Spinat 14 Tage nach Zugabe von Ioxynil zur Nährlösung schon bei 10mal kleinerer Herbizidkonzentration phytotoxische Symptome zeigt als dies bei Gerste der Fall ist.

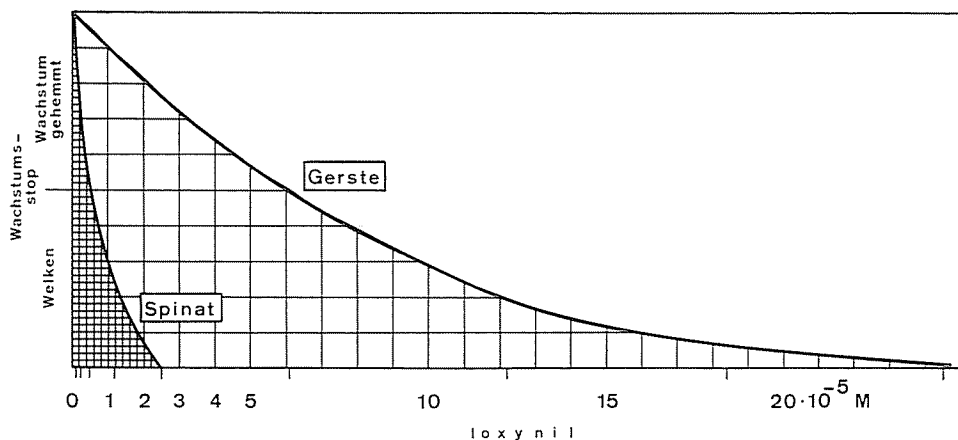


Abb. 2. Einfluss von Ioxynil auf das Wachstum von Spinat und Gerste.

Pflanzenzustand 14 Tage nach der Zugabe verschiedener in der Abbildung auf der Abszisse vermerkter Ioxynilmengen zu Wasserkulturen.

Die Konzentration welche bei Spinat das Wachstum stoppt, liegt bei $0,5 \cdot 10^{-5}$ M und für Gerste bei $6 \cdot 10^{-5}$ M. Letal wirkt für Spinat die Ioxynilkonzentration $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, während sie für Gerste $25 \cdot 10^{-5}$ M beträgt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die unterschiedliche Herbizidempfindlichkeit der beiden Testpflanzen auf keine scheinbare Resistenz sondern auf ein spezifisch verschiedenartiges Verhalten der Pflanzen zurückzuführen ist.

Aufnahme und Transport von Ioxynil in Spinat und Gerste. Ein erstes Merkmal für die differentielle Empfindlichkeit von Spinat und Gerste ist die unterschiedliche Aufnahmefähigkeit der Wurzeln für das Herbizid. Wird in beiden Testpflanzen die Aufnahme von ringmarkiertem Ioxynil aus einer Wasserkultur ($4,9 \cdot 10^{-6}$ M) während 50 Std. verfolgt, so erhält man den in Abb. 3 dargestellten Verlauf für die getrennt aus Wurzeln und Blättern mit Alkohol extrahierbaren sowie die in den Wurzeln verbleibenden Radioaktivitätsanteile.

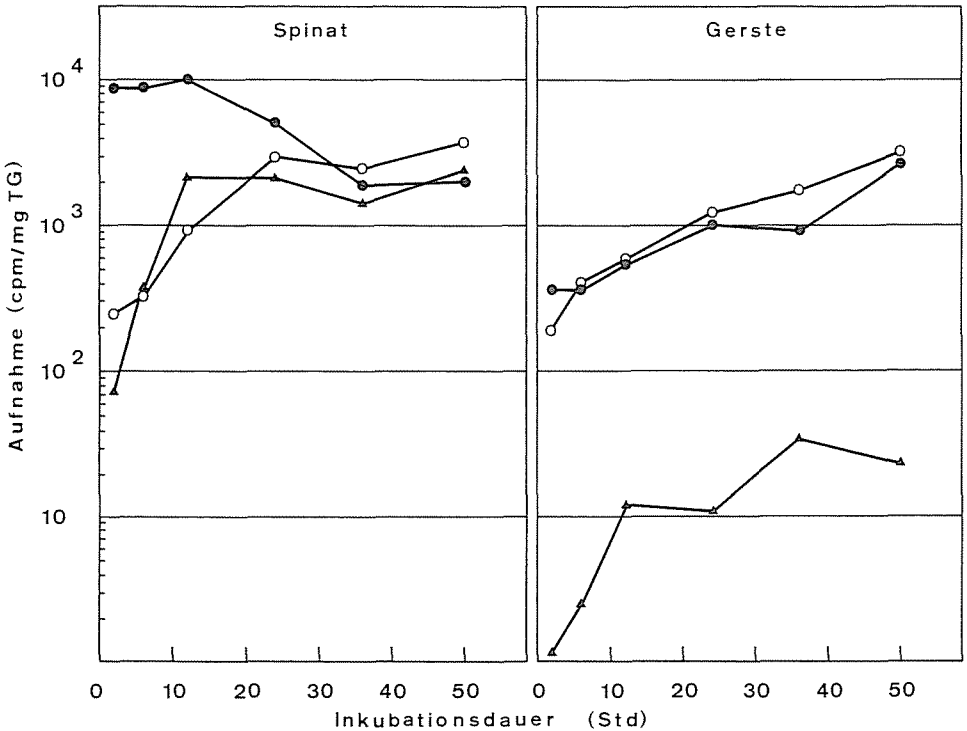


Abb. 3. Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ¹⁴C-ringmarkiertem Ioxynil aus Nährlösungen ($4,9 \cdot 10^{-6}$ M, $24,2 \cdot 10^6$ cpm) durch Spinat und Gerste.

Die ¹⁴C-Aktivitäten beziehen sich auf das trockene Pflanzenmaterial (TG). ●—● Alkoholextrakt aus Wurzeln, ○—○ ¹⁴C-Aktivität der Wurzelrückstände nach der Extraktion, ▲—▲ Alkoholextrakt aus Blättern.

Ein Vergleich der extrahierten ¹⁴C-Aktivitäten aus den Wurzeln beider Pflanzen zeigt, dass Ioxynil rascher von Spinat aufgenommen wird. Nach 2 Std. ist in den Wurzeln bereits eine maximale Herbizidkonzentration erreicht, die nach 12 Std. wieder abfällt, was ein Einstellen der Herbizidaufnahme nach diesem Zeitpunkt bedeutet. In Gerstenwurzeln wird nach 2 Std. eine 1000mal kleinere ¹⁴C-Aktivität festgestellt, die nach 50 Std. auf eine mit Spinat vergleichbare Aktivität kontinuierlich ansteigt.

Interessant ist ferner die Tatsache, dass Ioxynil von Spinatwurzeln gegen das Konzentrationsgefälle aufgenommen wird. Durch Umrechnung der nach 2 Std. mit Alkohol extrahierten ¹⁴C-Aktivität auf den molaren Ioxynilgehalt des Wurzel-Frischgewichtes (Wassergehalt der Wurzeln ca. 90%) ergibt sich eine Herbizidkonzentration von $3,3 \cdot 10^{-4}$ M, was gegenüber der Nährlösung ($4,9 \cdot 10^{-6}$ M) einer 100fachen Anreicherung entspricht.

Wird der zeitliche Verlauf der extrahierten Radioaktivitätsanteile aus den Blättern beider Versuchspflanzen verglichen, so widerspiegelt sich hier der an den Wurzeln beobachtete Effekt. Aus den Resultaten geht hervor, dass bei Spinat ein Transport von den Wurzeln in die Blätter vorliegt, der bei Gerste praktisch fehlt.

Vergleichende Untersuchungen der Wurzel- und Blätterextrakte ergeben in den Autoradiogrammen (Abb. 4a-c), dass die extrahierte ¹⁴C-Aktivität in Spinat dem unveränderten Ioxynil entspricht, während für Gerste eine Vielzahl von Abbauprodukten beobachtet wird.

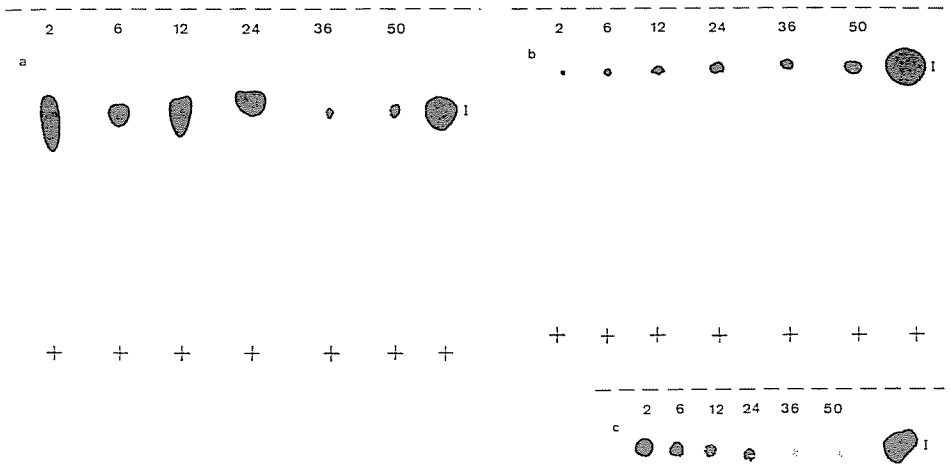


Abb. 4a-c. Radioautogramme (Fließmittel A) der in Abb. 3 erwähnten Alkoholextrakte.

Die Radioautogramme entsprechen den Extrakten, die nach 2-50stündiger Verfütterung von ringmarkiertem Ioxynil (I) aus Spinatwurzeln (a), Spinatblättern (b) und Gerstenwurzeln (c) stammen.

Da in Spinat keine weiteren Abbauprodukte auftreten, die zusätzlich phytotoxisch wirken könnten, kann nur Ioxynil selbst für die eigentliche herbizide Wirkung in dieser Pflanze verantwortlich sein. Die in Gerstenwurzelextrakten dem unveränderten Ioxynil zuzuschreibende ¹⁴C-Aktivität beträgt nach 2 Std. 42% und nach 50 Std. nur noch 2% der gesamthaft extrahierten radioaktiven Verbindungen.

Der im Unterschied zu Spinatpflanzen schon in den Gerstenwurzeln feststellbare sehr aktive Abbau weist auf Enzymsysteme in dieser Pflanze hin, die den Spinatwurzeln fehlen müssen. Die erwähnte Fähigkeit der Gerste, das angebotene Herbizid langsamer aufzunehmen und durch Abbau zu inaktivieren, ist wohl der Hauptgrund für das resistente Verhalten dieser Pflanze.

Die mit Alkohol nicht extrahierbare ¹⁴C-Aktivität der Wurzeln aus beiden Testpflanzen zeigt nach Abb. 3 grössenordnungsmässig den gleichen Anstieg. Möglicherweise handelt es sich hier um eine irreversible Absorption des aufgenommenen Ioxynil durch Pflanzeninhaltsstoffe wie z. B. durch Proteine. Eine Bindung an Proteine scheint auch nach den Untersuchungen von WEINBACH und GARBUS (1968), die eine Anlagerung von Nitro- und Halogenphenolen an Rinderserumalbumin nachweisen konnten, wahrscheinlich zu sein.

Resistenz und einzelne Stoffwechselforgänge. Ein zusätzlicher Grund für das unterschiedliche Verhalten von Gerste und Spinat könnte vorliegen, wenn die Stoffwechselforgänge in den Chloroplasten und Mitochondrien der Gerste unempfindlicher auf Ioxynil reagieren würden. (Einzelheiten über die Hemmung der erwähnten Vorgänge werden später behandelt.)

Wie Abb. 5 zeigt wird jedoch die Atmung der Wurzeln beider Testpflanzen durch Ioxynil mit nahezu der gleichen Konzentration (I_{50} Gerste = $6 \cdot 10^{-5}$ M; I_{50} Spinat = $4 \cdot 10^{-5}$ M) gehemmt.

Die Hemmung der CO₂-Fixierung von Spinat- wie auch von Gerstenchloroplasten

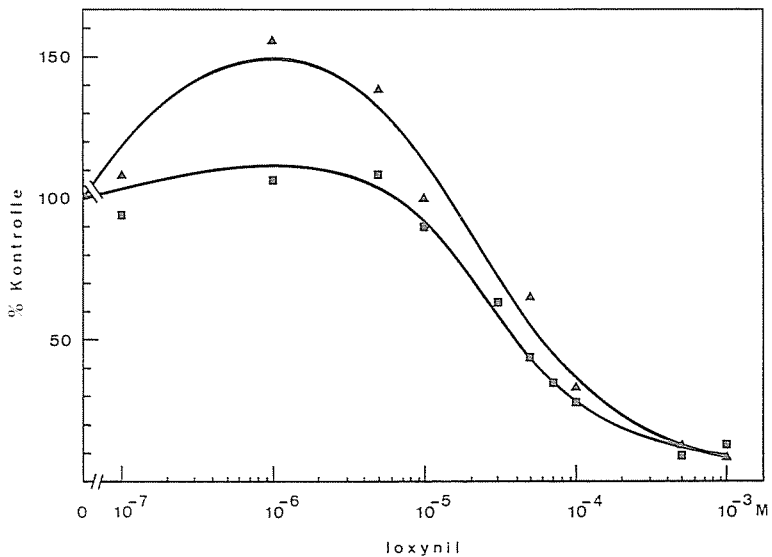


Abb. 5. Einfluss von Ioxynil auf die Wurzelatmung (O₂-Aufnahme) von Spinat- (□—□) und Gerstenwurzeln (▲—▲).

Experimentelle Bedingungen siehe Methoden 2 (d). Rate für unbehandelte Wurzeln: 0,25 μMol O₂/mg Wurzel (TG)·Std.

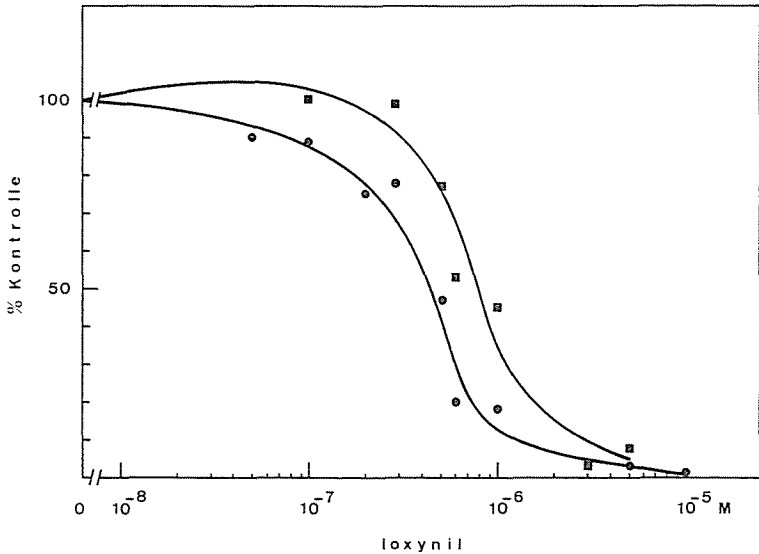


Abb. 6. Einfluss von Ioxynil auf die CO₂-Fixierung von Spinat- (●—●) und Gerstenchloroplasten (■—■).

Experimentelle Bedingungen siehe Abb. 14.

ergibt, wie aus Abb. 6 ersichtlich, fast gleiche I₅₀-Werte (I₅₀ Gerste = 8·10⁻⁷ M, I₅₀ Spinat = 4·10⁻⁷ M).

Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Befunden von FRANK und SWITZER (1969), HURTER et al. (1968) sowie ARNDT und KÖTTER (1968), wonach Chloroplasten aus resistenten Pflanzen gleich empfindlich auf Herbizide reagieren wie solche aus herbizidanfälligen Pflanzen.

Über die Wirkung von Ioxynil auf einzelne Stoffwechselfvorgänge in der Spinatpflanze. Um abzuklären, welche Stoffwechselfvorgänge in der ganzen Pflanze primär gehemmt werden, wurde vorerst an isolierten Wurzeln die Atmung und Phosphataufnahme untersucht. Anschliessend wurde an Ioxynil-inkubierten Pflanzen gleichzeitig die Wurzelatmung, die Phosphataufnahme, die photosynthetische CO₂-Fixierung und der P-Einbau in die Nucleinsäuren untersucht.

Die Versuche wurden an Spinatpflanzen durchgeführt, weil es sich gezeigt hatte, dass das Herbizid in dieser Pflanze nicht abgebaut wird. Mögliche Nebeneffekte, die durch eine Inaktivierung des Wirkstoffes als Folge eines Abbaues hervorgerufen würden, waren somit ausgeschaltet.

Hemmung der Wurzelatmung und Phosphataufnahme. Nach der heute gültigen Ansicht (siehe Übersicht von LEGGETT (1968)) wird die Aufnahme von Phosphat in die Wurzeln als aktiver Transport betrachtet, wobei die oxydative Phosphorylierung der Wurzelmitochondrien die nötige Energie in Form von ATP liefert. Eine Entkopplung dieser Reaktion, wie sie durch Ioxynil an isolierten pflanzlichen Mitochondrien von KERR und WAIN (1964) sowie FERRARI und MORELAND

(1969) nachgewiesen wurde, müsste in ganzen Wurzeln somit die Phosphataufnahme hemmen. Die Abklärung der herbiziden Empfindlichkeit dieses Vorganges ist von primärer Bedeutung, weil eine gestörte Nährstoffaufnahme sekundär weitere Stoffwechselsysteme in Mitleidenschaft ziehen kann.

Werden an frisch geernteten Spinatwurzeln in Gegenwart von Ioxynil Atmung und Phosphataufnahme gemessen, so ergeben sich die in Abb. 7 dargestellten Hemmkurven, die auf eine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung in den Wurzelmitochondrien schliessen lassen.

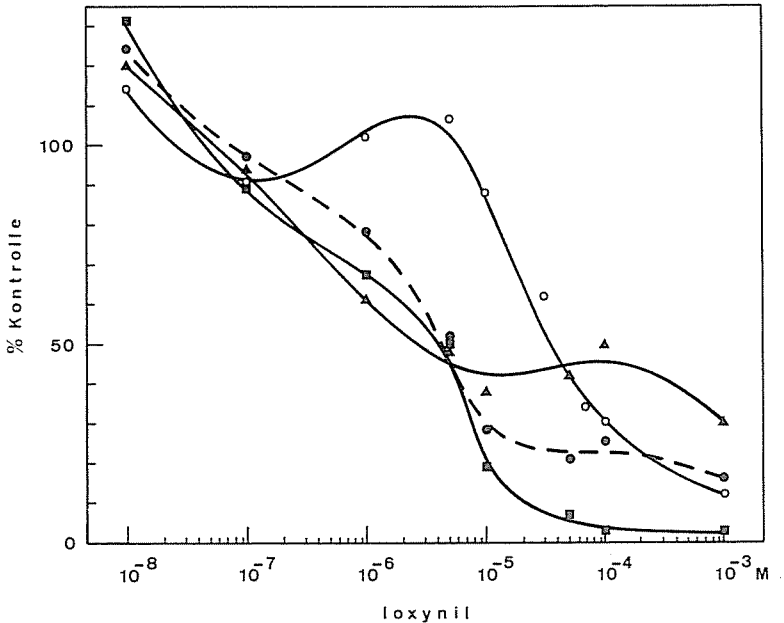


Abb. 7. Einfluss von Ioxynil auf die Atmung und Phosphataufnahme von Spinatwurzeln.

○—○ O₂-Aufnahme, ●—● total aufgenommenes HClO₄/Na₂SO₄-lösliches Phosphat, davon ▲—▲ anorganischer Anteil, ■—■ organischer Anteil (Nukleotide, Zuckerphosphate). Experimentelle Bedingungen siehe Methoden 2 (d).

Die Hemmung der Bildung des HClO₄/Na₂SO₄-löslichen organischen Phosphates (Nukleotide, Zuckerphosphate) bei 10mal kleinerer Ioxynilkonzentration ($I_{50} = 4 \cdot 10^{-6}$ M) als die Hemmung der Sauerstoffaufnahme ($I_{50} = 4 \cdot 10^{-5}$ M) spiegelt die Entkopplung der ATP-Bildung wieder. Bei höherer Konzentration deutet die Hemmung der Sauerstoffaufnahme auf eine Hemmung des Elektronentransportes in den Wurzelmitochondrien hin. Ein weiterer Hinweis für eine ATP-abhängige Phosphataufnahme stellten die praktisch gleich grossen Hemmstoffkonzentrationen für das total aufgenommene, HClO₄/Na₂SO₄-lösliche Phosphat ($I_{50} = 4 \cdot 10^{-6}$ M), dessen anorganischen ($I_{50} = 3 \cdot 10^{-6}$ M) und organischen ($I_{50} = 4 \cdot 10^{-6}$ M) Anteil dar. Die Hemmung der Phosphataufnahme muss demnach der Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung entsprechen.

Bei grösseren Hemmstoffkonzentrationen ($> 10^{-5}$ M), wo der Sauerstoffverbrauch ebenfalls abfällt, zeigen die Hemmkurven für das anorganische und organische Phosphat keinen parallelen Verlauf mehr. Obwohl die Bildung des organischen Phosphatanteiles (Nukleotide, Zuckerphosphate) total gehemmt ist, beträgt der anorganische Anteil immer noch 45% der Kontrolle.

Werden die Wirkstoffkonzentrationen für die Hemmung der Phosphataufnahme in Wurzeln mit den aus Abb. 2 ersichtlichen phytotoxisch wirkenden Inkubationskonzentrationen für Spinatpflanzen verglichen, so sind die Ergebnisse durchaus vergleichbar. Bei der Ioxynilkonzentration $5 \cdot 10^{-6}$ M tritt bei ganzen Pflanzen in Wasserkulturen ein Wachstumsstopp ein und bei der gleichen Konzentration wird an isolierten Wurzeln die Phosphataufnahme zu 50% gehemmt.

Zeitliche Beeinflussung der Wurzelatmung, der Phosphataufnahme, des Nukleinsäuremetabolismus und der CO_2 -Fixierung. Der festgestellte Zusammenhang zwischen der Hemmung der oxydativen Phosphorylierung in den Wurzeln und den auftretenden phytotoxischen Symptomen weist auf eine wesentliche Ursache der herbiziden Wirksamkeit von Ioxynil hin. Da sich zudem das Herbizid als Hemmstoff für die RNS- und Proteinbiosynthese (MORELAND et al., 1969) sowie für die Photosynthese (siehe Kapitel (2)) erweist, so stellt sich die Frage, mit welchen zusätzlichen Beiträgen die Beeinflussung dieser Vorgänge an der herbiziden Wirkung beteiligt sind.

Werden zur Abklärung dieser Frage an Spinatpflanzen, die auf Wasserkulturen mit $4,9 \cdot 10^{-6}$ M Ioxynil inkubiert wurden, gleichzeitig neben der Wurzelatmung und Phosphataufnahme die CO_2 -Fixierung und der ^{32}P -Einbau in die Nukleinsäuren der Blätter gemessen, so ergeben sich für die einzelnen Vorgänge die in Abb. 8 dargestellten zeitlichen Verläufe.

Nach 2stündiger Fütterung wird in den Wurzeln die Bildung des $\text{HClO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_4$ -löslichen organischen Phosphates (Nukleotide, Zuckerphosphate), das ein Mass für die Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung darstellt, zu 50% gehemmt, während die Sauerstoffaufnahme noch nicht beeinflusst wird. Dieses Verhalten entspricht dem Effekt, wie er nach 1stündiger Inkubation von isolierten Wurzeln mit $5 \cdot 10^{-6}$ M Ioxynil beobachtet wird (Abb. 7). Im Verlaufe von 50 Std. sinkt die organische Phosphatbildung kontinuierlich auf 15% und die Sauerstoffaufnahme auf 80% der Kontrolle ab. Dies deutet darauf hin, dass die ATP-Bildung in den Wurzelmitochondrien zunehmend entkoppelt wird und dass eine beginnende Hemmung des Elektronentransportes einsetzt. Da dieser Stoffwechselfvorgang primär und auch am stärksten gehemmt wird, so ist dieser Effekt die Hauptursache für die phytotoxische Wirkung des Ioxynil.

Der Verlauf des anorganischen Phosphatgehaltes wird im Gegensatz zur 1stündigen Inkubation isolierter Wurzeln im Herbizid (Abb. 7) nicht mehr parallel zum organischen Anteil gehemmt. Während in isolierten Wurzeln der anorganische Phosphatgehalt bei $5 \cdot 10^{-6}$ M Ioxynil 50% der Kontrolle beträgt, ist in Wurzeln ganzer Pflanzen nach 2 Std. keine Hemmung zu beobachten. Nach 10 Std. durchläuft der anorganische Phosphatanteil ein Maximum das 100% über der Kontrolle liegt. Dieser Effekt, der sich schon in den Versuchen mit isolierten Wurzeln bei grösseren Hemmstoffkonzentrationen ($> 10^{-5}$ M) angedeutet hatte, lässt vermuten, dass die

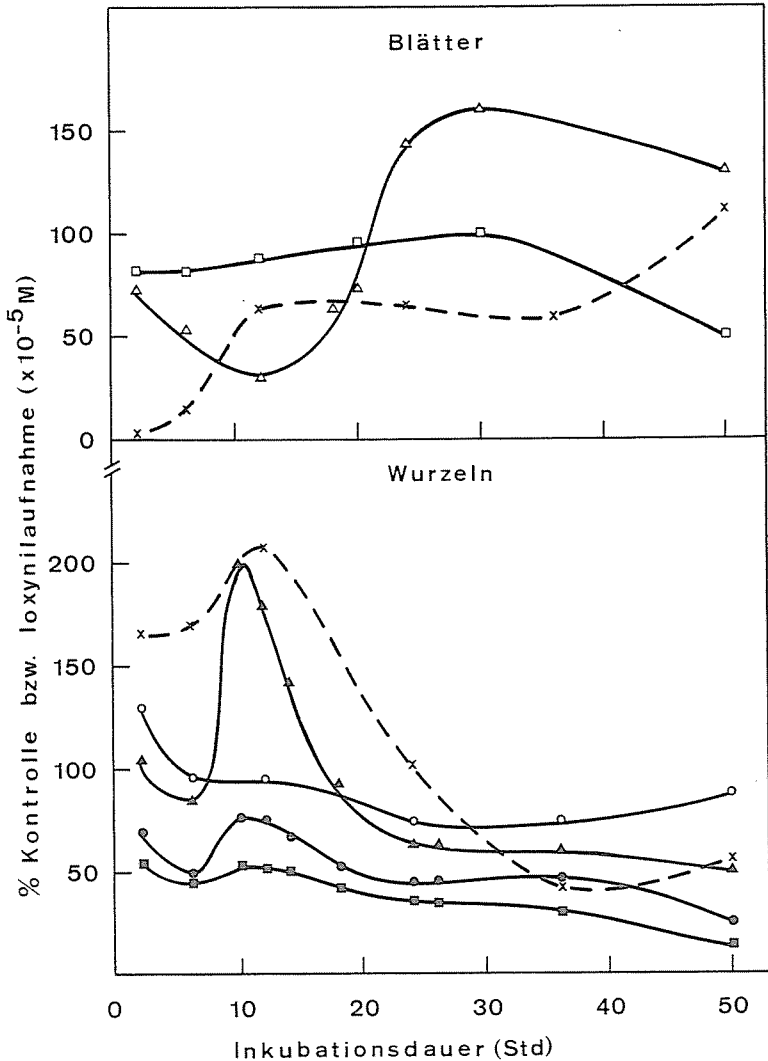


Abb. 8. Zeitlicher Verlauf des Einflusses von $4,9 \cdot 10^{-6}$ M Ioxynil (Wasserkultur) auf die Wurzelatmung, die Phosphataufnahme, den Nukleinsäuremetabolismus und die Photosynthese von Spinatpflanzen.

Wurzeln: ○ — ○ O₂-Aufnahme, ● — ● total aufgenommenes HClO₄/Na₂SO₄-lösliches Phosphat, davon ▲ — ▲ anorganischer Anteil, ■ — ■ organische Anteile (Nukleotide, Zuckerphosphate), x — x nach Abb. 3 auf das Frischgewicht der Wurzeln bzw. Blätter berechnete molare Ioxynilkonzentration.

Blätter: □ — □ CO₂-Fixierung, ▲ — ▲ ³²P-Einbau in die Nukleinsäuren.

Die Werte sind ausgedrückt als % der Raten, die für unbehandelte Pflanzen in den verschiedenen Zeitpunkten bestimmt wurden.

Durchschnittliche Raten der Kontrollpflanzen: O₂-Aufnahme: 0,22 μ Mol O₂/mg Wurzel (TG) · Std.; Phosphataufnahme: 0,035 μ Atom P/mg Wurzel (TG) · Std.; CO₂-Fixierung: 150 μ Mol CO₂/mg Chlorophyll · Std.; ³²P-Einbau in die Nukleinsäuren: 1,75 μ Atom P/mg Nukleinsäure · Std.

Phosphataufnahme nicht nur von der oxydativen Phosphorylierung abhängig ist.

Ebenso empfindlich wie die Bildung des $\text{HClO}_4/\text{Na}_2\text{SO}_4$ -löslichen organischen Phosphates in den Wurzeln wird der ^{32}P -Einbau in die Nukleinsäuren der Blätter beeinflusst. Dieser Vorgang sinkt nach 12 Std. auf 30% des Kontrollwertes ab und erreicht nach 30 Std. wiederum ein Maximum, das bei 160% liegt.

In einer analogen Untersuchung (BERÜTER und TEMPERLI, 1970) konnte für das Herbizid Prometryn [2,4-bis-(Isopropylamino)-6-methylmercapto-s-triazin] ein ähnlicher Effekt auf den ^{32}P -Einbau in die Nukleinsäuren festgestellt werden. Auf Grund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass der untersuchte Stoffwechselfvorgang trotz der strukturellen Verschiedenheit beider Herbizide in sehr ähnlicher Weise beeinflusst wird. Die für Ioxynil in den ersten 12 Std. beobachtete Hemmung könnte dem von MORELAND et al. (1969) beschriebenen Hemmeffekt auf die RNS-Polymerase sowie den ATP- und Orotat-Einbau in die RNS entsprechen. Die Hemmung dieser Stoffwechselfvorgänge steht jedoch im Gegensatz zu der nach 12 Std. eintretenden Aktivierung des ^{32}P -Einbaues in ganzen Pflanzen. Die Störung des Nukleinsäurehaushaltes dürfte ein zusätzlicher Faktor der phytotoxischen Eigenschaften von Ioxynil darstellen.

Die photosynthetische CO_2 -Fixierung in den Blättern der Ioxynil-haltigen Wasserkultur wird als unempfindlichster Vorgang erst nach 50 Std. gehemmt. Da die Pflanzen bereits nach 24 Std. zu welken beginnen, kann die Hemmung der Photosynthese erst sekundär für die phytotoxische Wirkung verantwortlich sein. Eine Hemmung der CO_2 -Fixierung würde eigentlich schon nach 12 Std. erwartet, weil zu diesem Zeitpunkt die Herbizidkonzentration in den Blättern bereits auf $6,5 \cdot 10^{-5}$ M angestiegen ist. Diese Hemmstoffkonzentration überschreitet um das 100fache die Ioxynilkonzentration $I_{50} = 4 \cdot 10^{-7}$ M, wie sie zur Hemmung der CO_2 -Fixierung in isolierten Chloroplasten benötigt wird (Abb. 6). Dieser scheinbare Widerspruch mag seinen Grund darin haben, dass das in die Blätter aufgenommene Herbizid von Membranbarrieren zurückgehalten wird und nicht in die Chloroplasten eindringen kann.

2. Über die Lokalisation der Hemmstelle von Ioxynil im Photosyntheseprozess isolierter Chloroplasten

Ioxynil und der photosynthetische Elektronentransport. Viele heute gebräuchliche Herbizide hemmen die Photosynthese. Nach der Übersicht von MORELAND (1967) vermögen besonders die Herbizide vom Typ der Harnstoffe, Triazine, Uracile sowie einige Benzotrile die photosynthetischen Reaktionen in isolierten Chloroplasten zu stören. Die Untersuchung dieser Hemmeffekte auf Chloroplastenniveau ist sowohl für die Erforschung der Wirkungsweise der Herbizide, als auch für die Aufklärung des Mechanismus der Photosynthese von Bedeutung.

Zur Lokalisation der Hemmstelle eines Herbizides im Photosyntheseprozess ist es notwendig, den Einfluss des Wirkstoffes auf die einzelnen Teilreaktionen des Prozesses zu untersuchen. Diese Teilreaktionen liefern primär über ein Elektronentransportsystem nach der Photolyse des Wassers zu Sauerstoff die physiologischen Energieträger NADPH_2 und ATP, welche nachfolgend für die CO_2 -Assimilation benötigt werden.

Nach der heutigen Kenntnis besteht das Elektronentransportsystem (Abb. 9) der Chloroplasten höherer Pflanzen aus zwei Lichtreaktionen, die den Potentialsprung zwischen H_2O/O_2 und $NADPH_2/NADP$ (1,14 V) in zwei Stufen überwinden, und die durch eine Reihe von Redoxkatalysatoren miteinander verbunden sind (über andere Vorstellungen siehe ARNON, 1967).

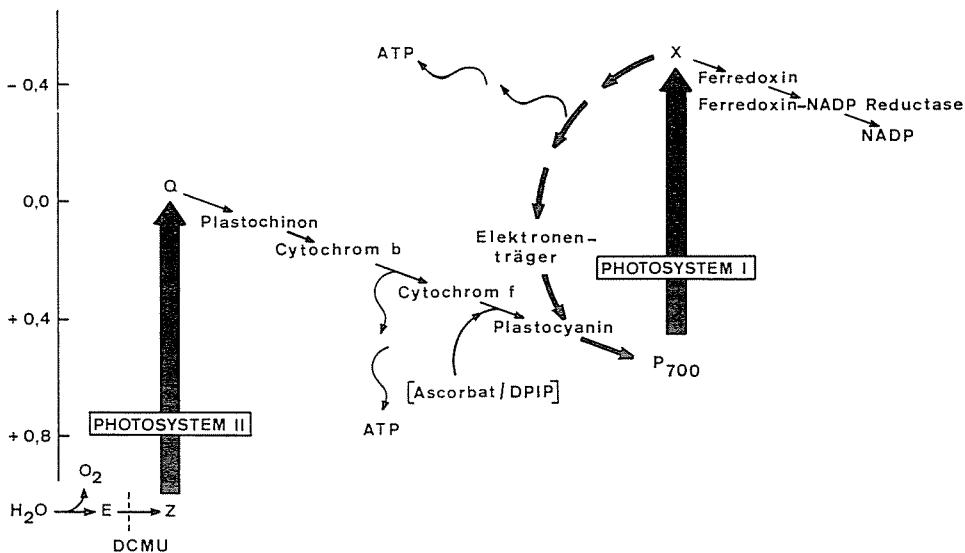


Abb. 9. Schema des photosynthetischen Elektronentransportes in isolierten Chloroplasten (nach AVRON und NEUMANN (1968), verändert).

Von den Trägern der Elektronentransportkette sind bisher neben den eigentlichen Pigmentsystemen, Ferredoxin, Ferredoxin-NADP-Reductase, Cytochrom f, Cytochrom b, Plastocyanin und Plastochinon charakterisiert und einander teilweise in der Kette zugeordnet worden. Die Phosphorylierungsstellen, als cyclische und nicht-cyclische bezeichnet, sind in der Kette noch nicht eindeutig festgelegt worden. Für das in photosynthetischen Untersuchungen häufig eingesetzte Herbizid 3,4-Dichlorphenyl-dimethylharnstoff (DCMU) ist die Hemmstelle eingehend erforscht (siehe Übersicht von MORELAND, 1967), und vor der Lichtreaktion II lokalisiert worden. In bezug auf Ioxynil liegen verschiedene, teils widersprüchliche Untersuchungen vor.

Der Wirkstoff hemmt in Bohnenchloroplasten die Hillreaktion mit Ferricyanid als Acceptor (WAIN, 1964), die NADP-Photoreduktion, die damit verbundene nicht-cyclische Phosphorylierung sowie die durch PMS katalysierte cyclische Phosphorylierung und die CO_2 -Fixierung (PATON und SMITH, 1965a, 1966).

Nach PATON und SMITH (1965b) hemmt Ioxynil auch die Photoreduktion des endogenen Plastochinon. Auf Grund dieser Untersuchung werden eine DCMU-analoga sowie eine weitere Hemmstelle in der Nähe des Plastochinon vermutet. FRIEND und OLSSON (1967) fanden in ähnlichen Untersuchungen nur die DCMU-analoga Hemmstelle bestätigt. Die Autoren stellten weiter fest, dass die NADP-

Reduktion auf Kosten des Elektronenlieferanten Ascorbat/DPIP nicht beeinflusst wird. GROMET-ELHANAN (1969) berichtet auf Grund vergleichender Untersuchungen mit photosynthetischen Hemmstoffen über zwei Typen des cyclischen Elektronentransportes. Für Ioxynil wurden hier wieder zwei verschiedene Hemmstellen lokalisiert.

Beiträge über den Einfluss von Ioxynil auf die photosynthetischen Reaktionen. Die teils widersprüchlichen Berichte über die Lokalisation der Hemmstelle von Ioxynil im photosynthetischen Elektronentransport gaben den Anstoss dieses Thema erneut eingehender zu behandeln. Bisherige Untersuchungen wurden mit Spinachchloroplasten neu überprüft und ergänzt, wobei als Mass für die betroffene Hemmstelle die Hemmstoffkonzentration I_{50} für die einzelnen photosynthetischen Teilreaktionen mit dem Herbizid bestimmt wurde.

In der ersten untersuchten Teilreaktion wird wie in Abb. 10 dargestellt die Sauerstoff-Entwicklung in der Hillreaktion mit Wasser als Elektronendonator und Kaliumferricyanid als Acceptor durch Ioxynil gehemmt. $I_{50} = 3 \cdot 10^{-7}$ M (WAIN, 1964; $I_{50} = 10^{-6}$ M).

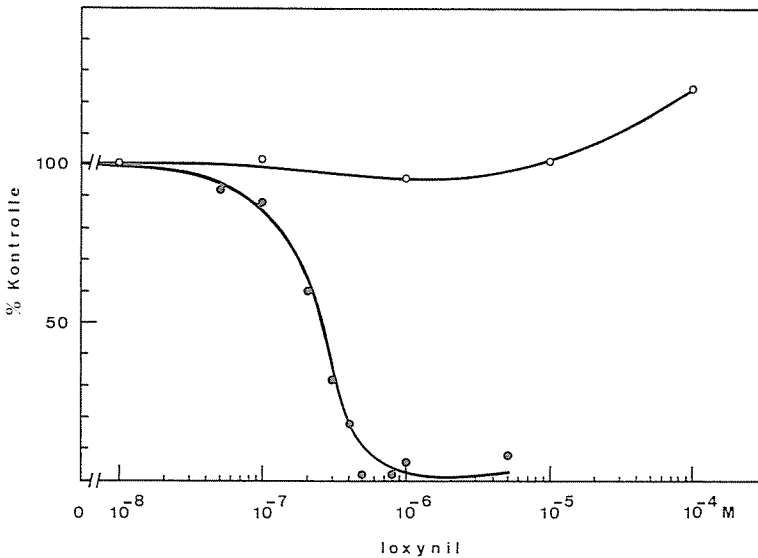


Abb. 10. Einfluss von Ioxynil auf die Hill-Reaktion ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ferricyanid}$) sowie auf die Teilreaktion mit Ascorbat/DPIP als Donator und NADP als Acceptor.

Die Reaktionsgemische enthielten im Endvolumen von 3,0 ml neben Chloroplasten entsprechend 0,25 mg Chlorophyll die folgenden Komponenten in μMol :

a) Hill-Reaktion (● ——— ● O_2 -Entwicklung): Tris-HCl-Puffer pH 7,6 100, NaCl 50, Na_2HPO_4 pH 7,6 2, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10, Zentrum des Warburggefässes: 0,2 ml 2n KOH mit Filterpapier. Reaktionsdauer unter Luft: 30 min. Rate: 10 $\mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chlorophyll} \cdot \text{Std}$.

b) Ascorbat/DPIP \rightarrow NADP (○ ——— ○ NADPH_2 -Bildung): Tris-HCl-Puffer pH 7,6 100, NaCl 50, Na_2HPO_4 pH 8,0 13, MgCl_2 10, Na-Ascorbat 20, DPIP 0,2, DCMU 0,02, Ferredoxin 0,2 mg. Reaktionsdauer unter Luft: 10 min. Rate: 20 $\mu\text{Mol NADPH}_2/\text{mg Chlorophyll} \cdot \text{Std}$.

Beim Einsatz von NADP als Elektronenacceptor ergeben sich für den nicht-cyclischen Elektronentransport die in Abb. 11 dargestellten Hemmverläufe. Die Sauerstoffentwicklung verhält sich dabei stöchiometrisch zur NADP-Reduktion und ATP-Bildung.

O₂-Entwicklung I₅₀ = 3 · 10⁻⁷ M
 NADP-Reduktion I₅₀ = 3 · 10⁻⁷ M (PATON und SMITH, 1965a: I₅₀ = 5 · 10⁻⁴ M)
 ATP-Bildung I₅₀ = 2 · 10⁻⁷ M (PATON und SMITH, 1965a: I₅₀ = 5 · 10⁻⁵ M)

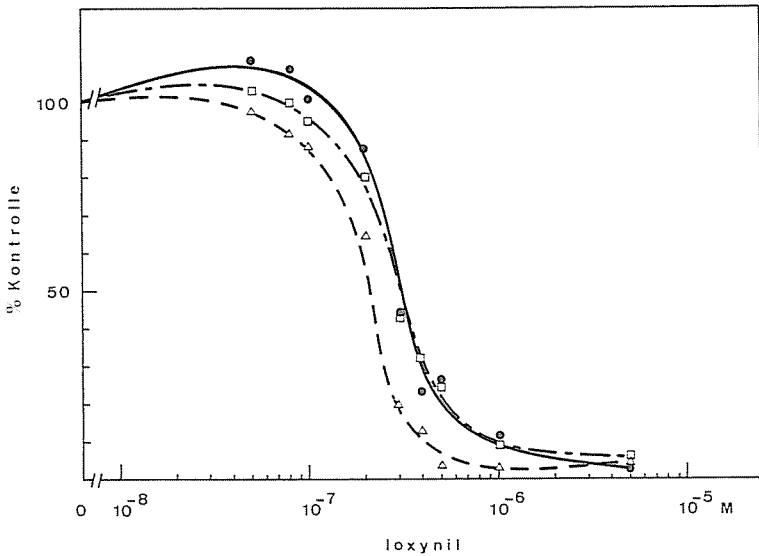


Abb. 11. Einfluss von Ioxynil auf den nichtcyclischen Elektronentransport und die nichtcyclische Phosphorylierung.

●—● O₂-Entwicklung, □—□ NADPH₂-Bildung, △—△ ATP-Bildung.
 Das Reaktionsgemische enthielt im Endvolumen von 3,0 ml neben Chloroplasten entsprechend 0,25 mg Chlorophyll die folgenden Komponenten in μMol: Tris-HCl-Puffer pH 7,6 100, NaCl 50, MgCl₂ 10, Na₂H³²PO₄ pH 7,5 10 (2,5 μCi), NADP 5,4, ADP 6, Ferredoxin 0,2 mg, Zentrum des Warburggefäßes: 0,2 ml 2n KOH mit Filterpapier. Reaktionsdauer unter Luft: 30 min. Raten (μMol Reaktionsprodukt/mg Chlorophyll · Std.): O₂ 20, NADPH₂ 44, ATP 38.

Mit nahezu der gleichen Hemmstoffkonzentration wie die Vorgänge des Elektronentransportes kann die CO₂-Fixierung an osmotisch intakten und gebrochenen Chloroplasten beeinflusst werden (Abb. 14). I₅₀ = 4–5 · 10⁻⁷ M (PATON und SMITH, 1965a: I₅₀ = 10⁻⁵ M). Die annähernd gleichen I₅₀-Werte für die Teilreaktionen des Elektronentransportes und der CO₂-Fixierung weisen darauf hin, dass die CO₂-Fixierung sekundär als Folge der Hemmung des Elektronentransportes blockiert wird, und dass keine weiteren Hemmstellen im Assimilationsprozess auftreten.

Durch Blockieren der Lichtreaktion II mit DCMU, und Einführen des Elektronendonator-Systems Ascorbat/DPIP (VERNON und ZAUGG, 1960) kann der Effekt von Ioxynil auf die Lichtreaktion I an der NADPH₂-Bildung untersucht werden. Es zeigt

sich (Abb. 10), in Übereinstimmung mit dem Ergebnis von FRIEND und OLSSON (1967), dass Ioxynil diese Teilreaktion nicht hemmt, sondern bei grösserer Hemmstoffkonzentration sogar stimuliert.

Dieser Effekt, und die gleich grossen I_{50} -Werte der Teilreaktionen des nicht-cyclischen Elektronentransportes ergeben für Ioxynil eine Hemmstelle in der Lichtreaktion II, wie sie für den Wirkstoff DCMU bekannt ist.

In der Annahme die Hemmung des Elektronentransportes werde sekundär durch die Blockierung der nichtcyclischen Phosphorylierung hervorgerufen, wurde der Effekt von Ioxynil auf eine nach KROGMANN et al. (1959) mit Ammoniumchlorid entkoppelte nichtcyclische Phosphorylierung untersucht.

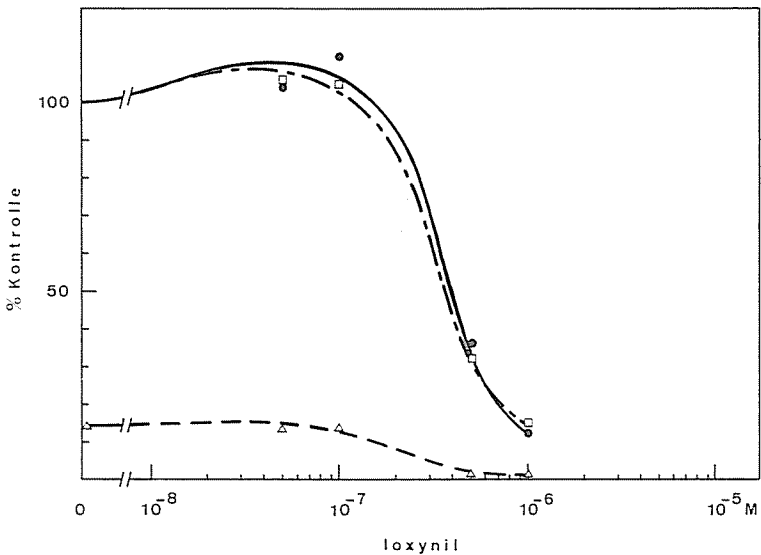


Abb. 12. Einfluss von Ioxynil auf den nichtcyclischen Elektronentransport bei entkoppelter nicht-cyclischer Phosphorylierung.

●—● O₂-Entwicklung, □—□ NADPH₂-Bildung, ▲—▲ ATP-Bildung.
Reaktionsbedingungen wie unter Abb. 11 zusätzlich 6 μ Mol NH₄Cl.

Es zeigt sich unter diesen Versuchsbedingungen (Abb. 12), dass der Elektronentransport (O₂-Entwicklung, NADP-Reduktion) hemmbar ist. $I_{50} = 4 \cdot 10^{-7}$ M. Somit muss die Hemmstelle primär im Elektronentransport und nicht im Mechanismus der Phosphorylierung liegen.

Die cyclische Phosphorylierung, in Gegenwart der Cofaktoren PMS (JAGENDORF und AVRON, 1958) oder Vitamin K₃ (ARNON et al., 1955) kann, wie aus Abb. 13 ersichtlich, mit Ioxynil in beiden Fällen gehemmt werden. $I_{50} = 2 \cdot 10^{-6}$ M (PATON und SMITH, 1965a; $I_{50} = 8 \cdot 10^{-6}$ M).

Weiter lässt sich durch den Wirkstoff als Folge der Hemmung der cyclischen Phosphorylierung die Proteinsynthese in den Chloroplasten hemmen. Dieser Effekt, der auch von RAMÍREZ et al. (1968) für den Hemmstoff Desaspidin beobachtet

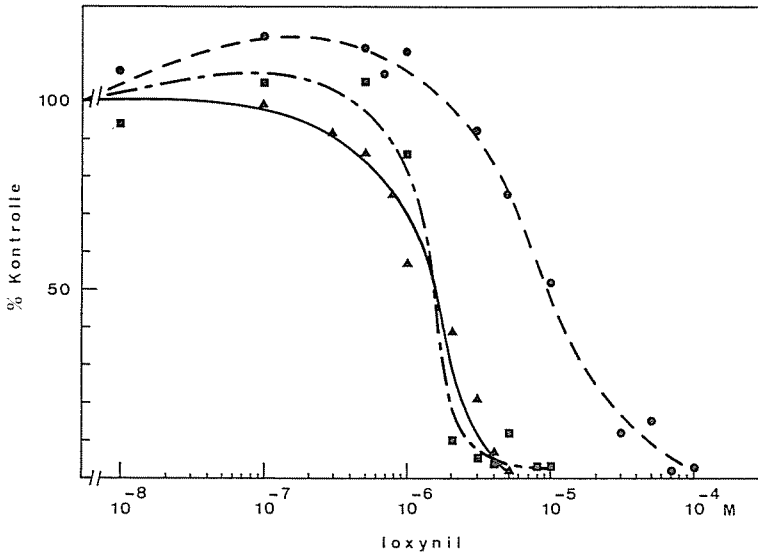


Abb. 13. Einfluss von Ioxynil auf die PMS- und K₃-cyclische Phosphorylierung sowie auf den ¹⁴C-Leucin-Einbau.

- a) PMS-cyclische Phosphorylierung (■ — — ■ ATP-Bildung). Das Reaktionsgemisch enthielt im Endvolumen von 3,0 ml neben Chloroplasten entsprechend 0,25 mg Chlorophyll die folgenden Komponenten in μ Mol: Tris-HCl-Puffer pH 7,6 100, NaCl 50, MgCl₂ 10, Na₂H³²PO₄ pH 8,0 10 (2,5 μ Ci), PMS 0,1, ADP 6. Die Reaktion dauerte unter Luft 10 min. Rate: 40 μ Mol ATP/mg Chlorophyll · Std.
- b) K₃-cyclische Phosphorylierung (▲ — — ▲ ATP-Bildung). Gleiche Bedingungen wie unter (a), ausgenommen: Gasphase Argon; statt PMS 0,3 μ Mol Vitamin K₃. Rate: 70 μ Mol ATP/mg Chlorophyll · Std.
- c) ¹⁴C-Leucin-Einbau (● — — ●). Das Reaktionsgemisch enthielt im Endvolumen von 1,5 ml neben «ganzen» Chloroplasten entsprechend 0,12 mg Chlorophyll die folgenden Komponenten in μ Mol: Tricin-KOH-Puffer pH 8,3 100, KCl 300, MgCl₂ 10, ¹⁴C-Leucin 0,04 (0,5 μ Ci). Die Reaktion dauerte unter Argon 25 min. Rate: 0,7 m μ Mol Leucin/mg Chlorophyll · Std.

wurde, wird auf das Fehlen des für die Proteinsynthese benötigten ATP zurückgeführt. Der Leucin-Einbau in die Proteine der Chloroplasten und damit die cyclische Phosphorylierung wird durch Ioxynil, wie aus Abb. 13 hervorgeht, bei I₅₀ = 10⁻⁵ M gehemmt.

Die Tatsache, dass Ioxynil auch die cyclische Phosphorylierung hemmt, was bei DCMU nicht der Fall ist (RAMÍREZ et al., 1968), weist auf eine weitere oder anders geartete Hemmstelle hin. Da die cyclischen Phosphorylierungen im Gegensatz zur DCMU-analogen Hemmung des Elektronentransportes bei 10–50mal grösserer Wirkstoffkonzentration gehemmt werden, lässt sich auf eine weitere Hemmstelle im cyclischen Elektronentransport oder auf eine Entkopplung der cyclischen Phosphorylierung schliessen.

Das Vorhandensein zweier durch verschiedene Hemmstoffkonzentrationen charak-

terisierte Hemmstellen konnte weiter über die CO_2 -Fixierung mit einem speziellen Cofaktoren enthaltenden Reaktionsgemisch indirekt bestätigt werden.

Wie Abb. 14 zeigt, wird die CO_2 -Fixierung durch Ioxynil analog zum nicht-cyclischen Elektronentransport an osmotisch intakten Chloroplasten in einem Reaktionsgemisch nach KALBERER et al. (1967) ohne weiteren Zusatz von Cofaktoren mit $I_{50} = 4 \cdot 10^{-7}$ M gehemmt. Der annähernd gleiche Hemmeffekt mit $I_{50} = 5 \cdot 10^{-7}$ M kann in einem modifizierten Reaktionsgemisch nach TREBST et al. (1958) mit gebrochenen Chloroplasten erhalten werden (Abb. 14).

Wird dem Reaktionsgemisch, das gebrochene Chloroplasten enthält, das künstliche Elektronendonatorsystem Ascorbat/DPIP zugegeben, so erhält man für die CO_2 -Fixierung den in Abb. 14 dargestellten Hemmeffekt mit $I_{50} = 10^{-6}$ M. Die Hemmung dieser Reaktion bei höherer Wirkstoffkonzentration zeigt, dass die im nichtcyclischen Elektronentransport durch $I_{50} = 5 \cdot 10^{-7}$ M charakterisierte Hemm-

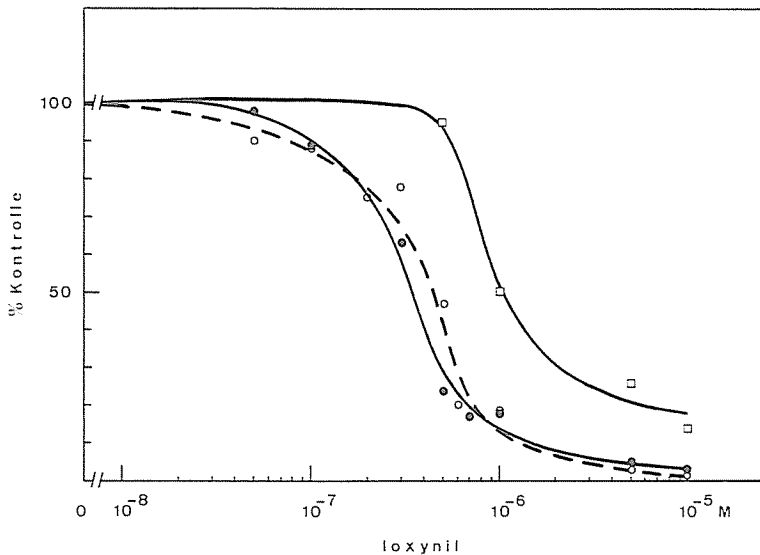


Abb. 14. Einfluss von Ioxynil auf die CO_2 -Fixierung.

- a) CO_2 -Fixierung an «ganzen» Chloroplasten ●—●. Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Endvolumen von 2.0 ml neben «ganzen» Chloroplasten entsprechend 0.5 mg Chlorophyll die folgenden Komponenten in μMol : HEPES-Puffer pH 7.6 100, Sorbit 580, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 8, Isoascorbinsäure 0.3, $^{14}\text{CO}_2$ 10 (10 μCi). Die Reaktionsgefäße wurden vor dem Freisetzen des $^{14}\text{CO}_2$ aus $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (im Gasraum) 3 min. belichtet. Die Reaktion dauerte unter Luft 20 min.
- b) CO_2 -Fixierung an «gebrochenen» Chloroplasten ○—○. Das Reaktionsgemisch enthielt im Endvolumen von 3.0 ml neben «gebrochenen» Chloroplasten entsprechend 0.25 mg und Chloroplastenextrakt entsprechend 1 mg Chlorophyll die folgenden Komponenten in μMol : Tris-HCl-Puffer pH 7.6 100, NaCl 10, MgCl_2 5, MnCl_2 2, Na_2HPO_4 pH 7.5 6, Na-ascorbat 10, Ribose-5-phosphat 0.3, ADP 2, NADP 2, $^{14}\text{CO}_2$ 10 (10 μCi), Ferredoxin 0.1 mg. Die CO_2 -Assimilation wurde wie unter (a) beschrieben durchgeführt. Reaktionszeit 30 min.
- c) CO_2 -Fixierung mit «gebrochenen» Chloroplasten in Gegenwart von Ascorbat/DPIP □—□. Gleiche Bedingungen wie unter (b), zusätzlich 0.2 μMol DPIP.

stelle durch Ascorbat/DPIP umgangen wird. Dabei wird das zur CO₂-Fixierung benötigte NADPH₂ durch die mit Ioxynil nicht hemmbare Teilreaktion Ascorbat/DPIP → NADP (Abb. 10) wieder gebildet. Da DPIP nach KEISTER (1963) ein Cofaktor der cyclischen Phosphorylierung sein kann, wird auch das für die CO₂-Fixierung erforderliche ATP wieder hergestellt. Die Hemmung der CO₂-Fixierung mit I₅₀ = 10⁻⁶ M entspricht annähernd der Hemmung der PMS- bzw. Vitamin-K₃-cyclischen Phosphorylierung (I₅₀ = 2 · 10⁻⁶ M). Dies weist darauf hin, dass die CO₂-Fixierung in diesem Fall von der cyclischen ATP-Bildung kontrolliert wird.

Die Hemmung der CO₂-Fixierung bei zwei verschiedenen Hemmstoffkonzentrationen bestätigt somit neben der Hemmung des nichtcyclischen Elektronentransportes das Vorhandensein einer zusätzlichen Hemmstelle im cyclischen Elektronentransport oder eine Entkopplung der cyclischen Phosphorylierung.

Die Hemmstoffkonzentration I₅₀ für den von der cyclischen Phosphorylierung abhängigen Leucin-Einbau ist mit 10⁻⁵ M etwas grösser als diejenige für die K₃ bzw. PMS-cyclische Reaktion (I₅₀ = 2 · 10⁻⁶ M). Es konnte aber für die gehemmte Proteinsynthese nachgewiesen werden, dass die Hemmstelle nur die cyclische Phosphorylierung und nicht ein weiterer Vorgang in der Proteinsynthese betrifft.

Wird, wie Abb. 15 zeigt, zu den Reaktionsgemischen des mit 5 · 10⁻⁵ M bzw. 10⁻⁴ M Ioxynil total gehemmten Leucin-Einbaues das ATP liefernde System Phosphorendolpyruvat/Pyruvatkinase zugegeben, so kann in den hemmstoffhaltigen Pro-

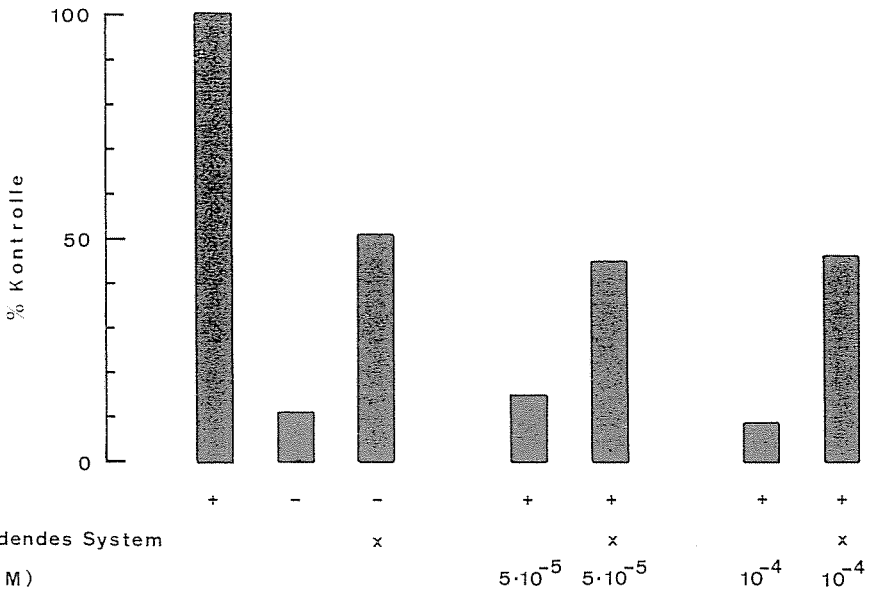


Abb. 15. Einfluss eines ATP-bildenden Systems auf den durch Ioxynil gehemmten Leucin-Einbau in isolierten Chloroplasten.

Die Reaktionsgemische waren wie in Abb. 13 zusammengesetzt und enthielten wo angegeben das ATP-bildende System (x) bestehend aus 1,5 μMol ATP, 7,5 μMol Phosphorendolpyruvat und 20 μg kristalline Pyruvatkinase.

ben wie in der Dunkelprobe die Hemmung wieder aufgehoben werden. Ioxynil vermag somit den eigentlichen Einbau von Leucin in die Proteine nicht zu beeinflussen. Eine Hemmung tritt erst auf, wenn die zur Proteinbiosynthese benötigte ATP-Bildung unterbunden wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vorliegenden Versuchsergebnisse auf zwei Hemmstellen von Ioxynil in der photosynthetischen Reaktionskette isolierter Chloroplasten hinweisen. Dabei hemmt Ioxynil bei kleiner Konzentration den Elektronentransport analog DCMU in der Lichtreaktion II. Die zweite Hemmstelle bei höherer Hemmstoffkonzentration dürfte im cyclischen Elektronentransport oder in der Entkopplung der cyclischen Phosphorylierung liegen.

3. Über den Abbau von Ioxynil in Gerstenwurzeln

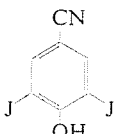
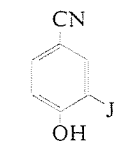
Strukturelle Merkmale ^{14}C - und ^{131}J -markierter Abbauprodukte. Aus den Autoradiogrammen in Abb. 4 ist ersichtlich, dass im Gegensatz zu Spinat in Gerstenwurzeln das aufgenommene Ioxynil abgebaut wird. Ein Abbau des Herbizids wurde bereits in Bohnenpflanzen und im Boden beobachtet, wobei als Metaboliten 3,5-Dijod-4-hydroxybenzoesäure und Jodid-Ionen nachgewiesen wurden (WAIN et al., 1966; ZAKI et al., 1967).

Um den Verlauf des in Gerstenwurzeln auftretenden Ioxynilabbaues näher zu untersuchen, wurde im folgenden die aus $^{14}\text{C}\equiv\text{N}$ -, ring- und ^{131}J -markiertem Ioxynil sowie die aus ^{131}J -3-Jod-4-hydroxybenzonnitril entstandenen Metaboliten an Hand ihrer radioaktiven Markierung charakterisiert.

Werden die Pflanzen den erwähnten radioaktiven Verbindungen in Wasserkulturen ausgesetzt, so lassen sich nach 90 Std. mit 80% igem Alkohol aus den Wurzeln die in Tabelle 1 zusammengestellten Radioaktivitätsanteile extrahieren.

Nach der zweidimensionalen Auftrennung der Extrakte zeigen die Verteilmuster der Autoradiogramme (Abb. 16a, b), dass noch unverändertes Ioxynil bzw. 3-Jod-4-hydroxybenzonnitril (Fleck 1 bzw. 25) nachweisbar ist.

Tabelle 1. Inkubation von Gerste-Wasserkulturen mit verschiedenartig radioaktiv markiertem Ioxynil ($4,9 \cdot 10^{-6}$ M) sowie ^{131}J -3-Jod-4-hydroxybenzonnitril ($7 \cdot 10^{-6}$ M)

Nr.	applizierte Verbindung	radioaktive Markierung	cpm in Nährlösung vorgelegt	cpm extrahiert	mg Wurzel Trocken-Gewicht (TG)	cpm/mg Wu TG
I		^{14}C -Ring	7 230 000	3 500 000	150	23 350
II		$^{14}\text{C}\equiv\text{N}$	38 125 000	932 000	229	4 070
III		^{131}J	3 010 000	1 165 000	183	6 360
IV		^{131}J	3 126 000	930 000	274	3 400

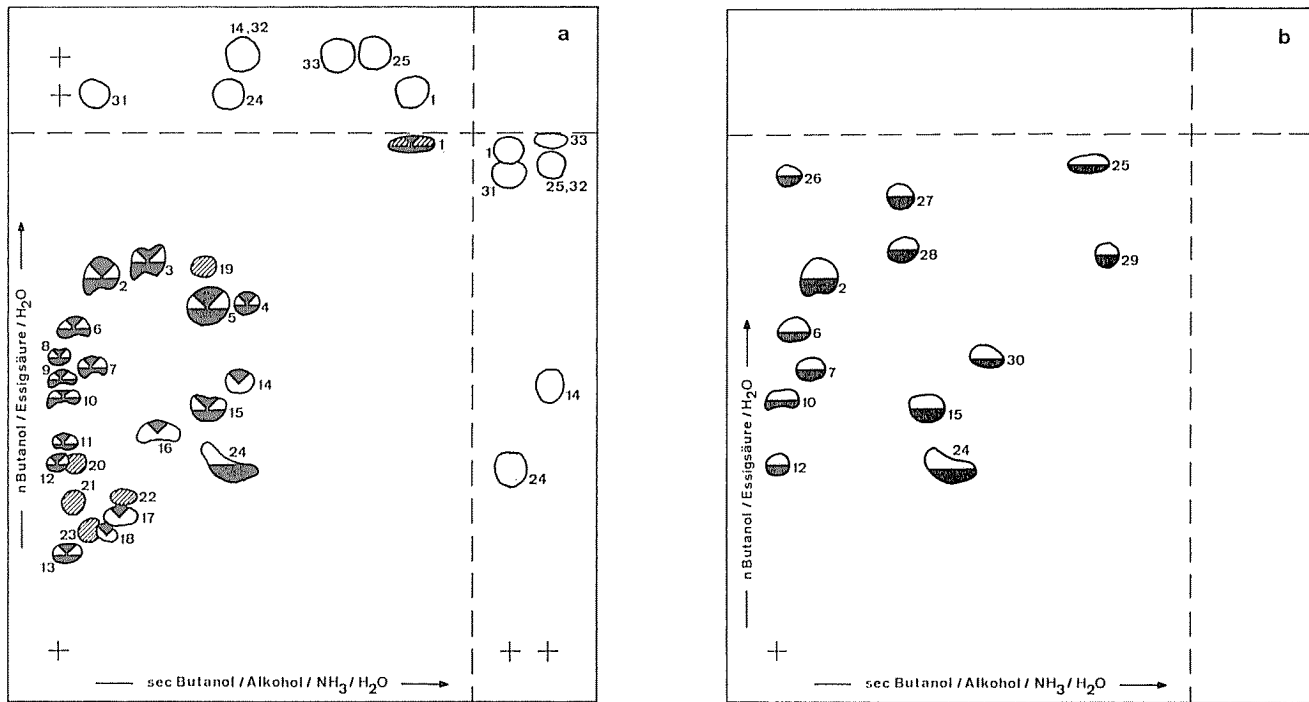


Abb. 16a, b. Zusammenstellung der Autoradiogramme (Fließmittel A, B) von Ioxynil- (a) bzw. 3-Jod-4-hydroxybenzonnitril-Metaboliten (b) der in Tabelle I erwähnten Extrakte aus Gerstenwurzeln.

- ^{14}C -ringmarkierte Metaboliten 1–18.
- ◐ ^{131}I -markierte Metaboliten 1–13, 15, 24–30.
- ◑ ^{14}C -N-markierte Metaboliten 1, 19–23.
- Referenzverbindungen: 1 Ioxynil, 25 3-Jod-4-hydroxy-benzonnitril, 24 Jodid, 14 Arbutin, 14 Arbutin, 32 3,5-Dijod-4-hydroxy-benzamid, 31 3,5-Dijod-4-hydroxybenzoesäure, 33 2,6-Dijod-phenol.

Die vermuteten primären Abbauprodukte des Ioxynil (3,5-Dijod-4-hydroxybenzamid bzw. 3,5-Dijod-4-hydroxybenzoesäure), wie sie von WAIN et al. (1966) in Bohnenpflanzen gefunden wurden, können in Gerstenwurzeln nicht beobachtet werden. Dagegen kann sowohl für Ioxynil als auch für das Monojodderivat durch Cochromatographie abgespaltenes Jodid (Fleck 24) nachgewiesen werden. Ebenfalls durch chromatographischen Vergleich lässt sich der ringmarkierte Ioxynilmetabolit 14 als Arbutin (Glucosid des Hydrochinon) identifizieren.

Eine Bestimmung der prozentualen radioaktiven Verteilung der zahlenmässig überwiegenden ringmarkierten Stoffe (17 Flecken) zeigte, dass Fleck 5 mit 20% als Hauptmetabolit auftritt, während die Anteile der restlichen Komponenten zwischen 0,5 und 4% liegen. Es ist anzunehmen, dass die erwähnten Verbindungen den intakten Phenylring noch enthalten. Ein Abbau im Sinne einer Ringöffnung wurde nämlich für phenylhaltige Herbizide wie Phenoxyalkansäuren, substituierte Harnstoffe, Phenylcarbamate und Derivate der Benzoesäure in der Pflanze bis heute noch nie beobachtet (LOOS, GEISSBÜHLER, HERRETT, SWANSON. In: KEARNEY und KAUFMANN, 1969).

Keine der im Autoradiogramm sichtbaren nitrilmarkierten Ioxynilmetaboliten (Flecke 19–23) lassen sich mit den ring- und jodmarkierten Abbauprodukten zur Deckung bringen. Weiter entsprechen der relativ kleineren ^{14}C -Aktivität des $^{14}\text{C}\equiv\text{N}$ -Extraktes II (Tab. I) nur 5 Flecke (19–23) im Autoradiogramm, während es beim ringmarkierten Extrakt I analog der grösseren ^{14}C -Aktivität 17 Komponenten (2–18) sind. Dies weist darauf hin, dass die Nitrilgruppe des Ioxynil abgespalten wird.

Die um das C-Atom der Nitrilgruppe ärmeren, ringmarkierten Abbauprodukte unterscheiden sich weiter in ihrem Jodgehalt. Keine Jodmarkierung tragen die Stoffe 14, 16, 17 und 18. Zum Auffinden der Monojodderivate werden die Verteilmuster für die aus 3-Jod-4-hydroxybenzonnitril bzw. Ioxynil entstandenen jodmarkierten Metaboliten (Abb. 16a, b) untereinander verglichen. Die Flecken 2, 6, 7, 10, 12 und 15 treten in beiden Chromatogrammen auf, was somit auf Monojodmetaboliten des Ioxynil hinweist. Bei den Flecken 3, 4, 5, 8, 11 und 13 dürfte es sich um Dijodverbindungen handeln, weil diese im jodmarkierten Verteilmuster des 3-Jod-4-hydroxybenzonnitril nicht nachweisbar sind.

Die im Autoradiogramm der Abb. 16a dargestellten ringmarkierten Abbauprodukte lassen sich durch Ausschütteln mit Äther bei pH 11 und pH 5 weiter auftrennen. Ein zu diesem Zweck durch schonende Extraktion aus den Wurzeln hergestellter Rohextrakt ergibt nach der Fraktionierung die in Tabelle 2 dargestellte Verteilung der ^{14}C -Aktivität.

Daraus ist ersichtlich, dass beim Einengen der Wurzelextrakte 1–4 ein ^{14}C -Aktivitätsverlust von 19% auftritt. Da ebenfalls beim Ausschütteln des Rohextraktes weitere Verluste zu beobachten sind, muss auf das Vorhandensein flüchtiger Metaboliten geschlossen werden. Die im Ätherextrakt pH 5 befindlichen Verbindungen können den Flecken 1–3 im Autoradiogramm der Abb. 16a zugeordnet werden. Neben Ioxynil (Fleck 1) dürfte es sich hier um weitere jodierte Phenole handeln. Der weitaus grösste ^{14}C -Anteil mit den Verbindungen 4–18 verbleibt in der Wasserphase. Auf Grund der Unlöslichkeit in Äther werden bei diesen Metaboliten wie bereits beim identifizierten Arbutin (Fleck 14) Glucoside von Ioxynil-Abbauprodukten vermutet.

Tabelle 2. Extraktion und Fraktionierung von Ioxynil-Abbauprodukten aus Gerstenwurzeln
30 Pflanzen wurden 12 Tage auf einer Wasserkultur mit 21 620 200 cpm ¹⁴C-ringmarkiertem Ioxynil inkubiert

Nr.	Fraktion	Radioaktivität (cpm) (%)	Komponenten in Abb. 16a	
1	Alkohol 90%	3 262 500	Extraktion	
2	Alkohol/Äther 3 : 1	310 250		
3	Alkohol/Äther 3 : 1	73 958		
4	Äther	57 845		
5	Frakt. 1-4 eingeeengt (Rohextrakt)	3 008 888	81	1-18
6	Ätherextrakt pH 11	66 944	2	
7	Ätherextrakt pH 5	260 000	7	1-3
8	Wasserphase	2 072 680	56	4-18
9	Wurzelrückstände	671 237		

Entfernung der Nitrilgruppe. Wie bereits erwähnt, ist auf Grund eines Vergleichs der chromatographischen Verteilmuster ring- und nitrilmarkierter Ioxynil-metaboliten eine Abspaltung der Nitrilgruppe zu einem flüchtigen Metaboliten wahrscheinlich. Diese Annahme kann durch Bestimmen des ¹⁴CO₂ bestätigt werden, das aus ¹⁴C-Ioxynil in Gerste freigesetzt wird. Zu diesem Zweck wurden Gerstenpflanzen auf Wasserkulturen mit ¹⁴C≡N bzw. ¹⁴C-ringmarkiertem Ioxynil inkubiert. Die Pflanzen wurden unter Glasglocken gebracht, und das abgegebene ¹⁴CO₂ nach Durchleiten eines Luftstromes in Natronlauge absorbiert.

Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, dass bei der Inkubation von Gerste mit ¹⁴C≡N-markiertem bzw. ¹⁴C-ringmarkiertem Ioxynil im ersten Fall eine stärkere Freisetzung von ¹⁴CO₂ feststellbar ist. Das Ergebnis dürfte auf eine Hydrolyse der Nitrilgruppe und anschließende Decarboxylierung der entstandenen Säure zurückzuführen sein. Produkte dieser Reaktionskette wie 3,5-Dijod-4-hydroxybenzoesäure bzw. 2,6-Dijodphenol können jedoch im Autoradiogramm (Abb. 16a) nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 3. Freisetzung von ¹⁴CO₂ aus ¹⁴C-Ioxynil in Gerstenpflanzen

Die Wasserkulturen mit je 15 Pflanzen kamen 3 Tage nach der Herbizidzugabe zur Absorption des abgegebenen ¹⁴CO₂ während 24 Std. unter Glasglocken.

Applizierte Verbindung	Radioaktivität (cpm)	
	in Nährlösung vorgelegt	während 24 Std. freigesetztes ¹⁴ CO ₂
¹⁴ C≡N-Ioxynil	38 125 000	25 000
¹⁴ C-ringmarkiertes Ioxynil	7 230 000	900
Kontrolle	—	—

Versuche zur Isolierung und Identifikation von Hauptmetabolit 5. Auf Grund des Verteilmusters im Autoradiogramm der Abb. 16a besitzt der ringmarkierte Hauptmetabolit 5 noch beide Jodatome. Sein Anteil beträgt 20% der gesamthaft aus den Gerstenwurzeln extrahierten ¹⁴C-Aktivität. Zu seiner Isolierung wurde der in Tabelle 1 erwähnte jodmarkierte Extrakt III (29 100 cpm) verwendet. Durch Ausschütteln mit Äther bei pH 5 konnten vorerst die Verbindungen entfernt werden, welche im Autoradiogramm der Abb. 16a den Flecken 1–3 entsprechen. Der Hauptmetabolit 5 wurde aus der Wasserphase durch zweimalige präparative Papierchromatographie mit einer Ausbeute von 5040 cpm gewonnen.

Nach Behandlung des isolierten Abbauproduktes mit Emulsin wird die Verbindung ätherlöslich (Tabelle 4), was auf das Vorhandensein eines Glucosides hinweist.

Der radioaktive Ätherextrakt der Emulsinspaltung zeigt im Autoradiogramm der Abb. 17 zwei Flecken.

Tabelle 4. Spaltung des jodmarkierten Hauptmetaboliten 5 mit Emulsin

Fraktion	Radioaktivität (cpm)	
	– Emulsin	+ Emulsin
Hauptmetabolit 5	1716	1716
Ätherextrakt	0	580
Wasserphase	1402	440

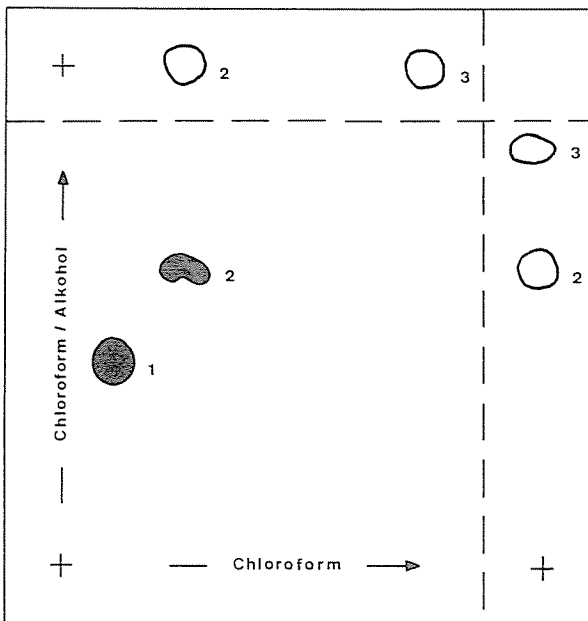


Abb. 17. Autoradiogramm (Fließmittel C, D) der Emulsinspaltung des jodmarkierten Hauptmetaboliten 5.

1 unbekannter Metabolit, 2 2,6-Dijodhydrochinon, 3 2,6-Dijodchinon.

Demnach muss der gespaltene Hauptmetabolit 5 aus zwei sehr ähnlichen Glucosiden bestehen, die sich auf dem Papierchromatogramm mit den Fließmitteln A und B nicht weiter auftrennen liessen.

Die kleinere Komponente 2 im Autoradiogramm der Spaltprodukte entspricht dem vermuteten 2,6-Dijodhydrochinon, während die grössere Komponente 1 nicht identifiziert werden konnte. Es dürfte sich wahrscheinlich bei dem unbekanntem Aglukon um das 2,6-Dijodresorcin handeln. Diese Annahme wird gestützt durch Untersuchungen von VERLOOP und NIMMO (1969), die in Bohnenpflanzen eine Hydroxylierung des Herbizides 2,6-Dichlorbenzonnitril feststellten. Dabei wurden als Metaboliten zu 15% das 4-Hydroxy-2,6-dichlorbenzonnitril und zu 65% das 3-Hydroxy-Analoge sowie deren Glucoside nachgewiesen.

Abbauweg von Ioxynil in Gerstenwurzeln. Aus den Resultaten der vorliegenden Untersuchung kann für den Abbau von Ioxynil in Gerstenwurzeln der in Abb. 18 dargestellte Weg skizziert werden.

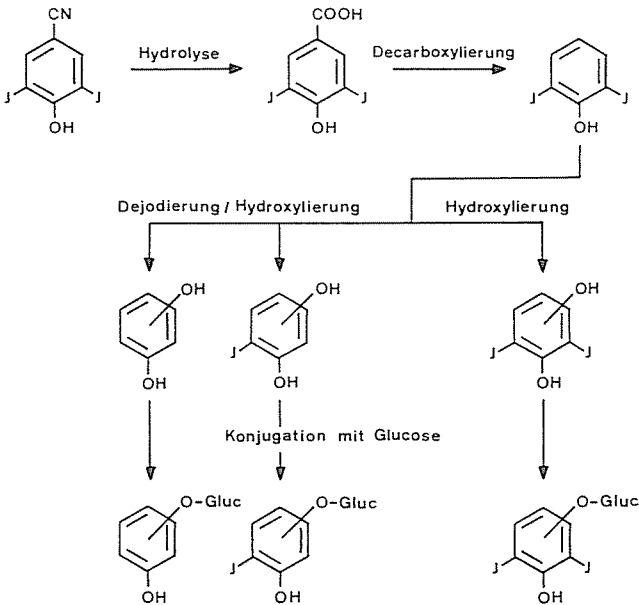


Abb. 18. Schema des Abbaues von Ioxynil in Gerstenwurzeln.

Die Nitrilgruppe wird wahrscheinlich über das Amid zur Säure hydrolysiert, die anschliessend decarboxyliert wird. Diese Reaktion scheint den primären Schritt im Abbau des herbiziden Wirkstoffes darzustellen, da die in der Pflanze gebildeten ¹⁴C-ringmarkierten Metaboliten das C-Atom der Nitrilgruppe nicht mehr enthalten. Nach erfolgter Hydroxylierung des 2,6-Dijodphenols in 4 und wahrscheinlich auch in 3 Stellung werden die entsprechenden Glucoside gebildet, die sich als Hauptmetaboliten in der Pflanze anhäufen. Zwischenprodukte dieser Reaktionskette, wie das erwähnte 2,6-Dijodphenol können in der Pflanze nicht nachgewiesen werden. Als

weiteres Abbauprodukt tritt Arbutin auf, das durch Dejodierung, Hydroxylierung und Glucosidbildung aus 2,6-Dijodphenol entstanden sein muss. In ähnlicher Weise dürfte es sich bei den nicht identifizierten Abbauprodukten um teilweise dejodierte und hydroxylierte Phenole sowie deren Konjugate handeln.

Die beobachteten Abbaureaktionen von Ioxynil in Gerstenwurzeln entsprechen mit Ausnahme der Dejodierung weitgehend den Abbauwegen, wie sie für Herbizide mit halogeniertem aromatischen Ring bekannt sind (siehe Übersichten in: KEARNEY und KAUFMANN, 1969). Dabei scheint der Abbau von Seitenketten, Hydroxylierung des aromatischen Ringes und Konjugation mit Pflanzeninhaltsstoffen in verschiedenen Pflanzen von wesentlicher Bedeutung zur Inaktivierung der aufgenommenen Herbizide zu sein. Eine Dehalogenierung besonders chlorhaltiger Wirkstoffe wurde in Pflanzen kaum nachgewiesen. Die für Ioxynil festgestellte Dejodierung ist daher auf die allgemein bekannte kleinere Stabilität von Jodverbindungen zurückzuführen.

Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass durch die Pflanzenwurzeln aufgenommenes Ioxynil primär die Atmung hemmt. Dies bewirkt eine gestörte Nährstoffaufnahme. Als weiterer energieliefernder Prozess wird sekundär die Photosynthese gehemmt. Die Störung dieser Stoffwechselforgänge, wie sie in ähnlicher Weise bei den Herbiziden vom Typ der Harnstoffe, Triazine und Nitro- sowie Halophenolen beobachtet wird, stellt den Hauptgrund für die phytozide Wirkung von Ioxynil dar. Die im Freiland beobachtete Resistenz der Monokotyledonen (WAIN, 1963; CARPENTER et al., 1964) gegenüber diesem Herbizid lässt sich an Gerste auf den Abbau des Wirkstoffes in der Pflanze zurückführen. Den empfindlicheren Dikotyledonen dürften, wie an Spinat beobachtet, die für den Abbau des Wirkstoffes nötigen Enzymsysteme fehlen.

Zur Beurteilung der in den Erntegütern verbleibenden Pestiziden sind Rückstandsuntersuchungen erforderlich, die meist auf den unveränderten Wirkstoff ausgerichtet sind. Die gefundenen Rückstandsmengen müssen dabei unter dem aus toxikologischen Untersuchungen bekannten Toleranzwert liegen. Dieser Wert bezieht sich auf den unveränderten Wirkstoff, wobei die in den Pflanzen entstandenen Metaboliten meistens nicht berücksichtigt werden. Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass aus dem Herbizid Ioxynil eine grosse Zahl von Metaboliten entstanden ist, die in der Pflanze verbleiben. Es stellen sich hier die Fragen nach der toxikologischen Bedeutung dieser Stoffe, soweit sie in die Nahrung gelangen, und auf die Wirkung der Ökologie des Bodens.

Von den Rückständen chlorierter Kohlenwasserstoffe ist bekannt, dass sie im tierischen Fett angereichert werden. Die Vermutung, dass es auch für hydrophile Stoffe die Möglichkeit zur Anreicherung z. B. in bestimmten Proteinen gibt, drängt sich daher auf. Die Ergebnisse mit Ioxynil lassen vermuten, dass dieses Phenol möglicherweise an Eiweisse angelagert wird. Es wäre somit denkbar, dass für wasserlösliche halogenhaltige Phenole ähnliche Rückstandswege bei Proteinen auftreten, wie dies von der Insektizidgruppe der chlorierten Kohlenwasserstoffe beim Fett bekannt ist.

Zusammenfassung

1. Gerstenpflanzen zeigen auf Wasserkulturen eine 10mal grössere Resistenz gegenüber dem herbiziden Wirkstoff 3,5-Dijod-4-hydroxybenzonnitril (Ioxynil) als Spinatpflanzen. Die Gründe für das unterschiedliche Verhalten werden durch folgende Faktoren bedingt: Im Gegensatz zu Spinat, wo eine aktive Herbizidaufnahme durch die Wurzeln und ein Transport in die Blätter stattfindet, ist bei Gerste eine langsamere Aufnahme und das Fehlen eines Transportes in die Blätter zu beobachten. Das aufgenommene Herbizid wird von Spinat nicht abgebaut, während in den Wurzeln der Gerste ein sehr aktiver Abbau nachweisbar ist. Die Resistenz der Gerste kann nicht auf weniger empfindliche Stoffwechselfvorgänge zurückgeführt werden, da die Wurzelatmung und die CO₂-Fixierung isolierter Chloroplasten für Gerste und Spinat mit den gleichen Ioxynilkonzentrationen zu 50% gehemmt werden.

Von den an Ioxynil-inkubierten Spinatpflanzen gemessenen Stoffwechselfvorgängen wird in den Wurzeln die oxydative Phosphorylierung am stärksten betroffen. Gleichzeitig und ebenso empfindlich wird der Phosphor-Einbau in die Nukleinsäuren der Blätter beeinflusst. Die Photosynthese (CO₂-Fixierung) wird sekundär zu diesen Vorgängen gehemmt.

2. Ioxynil hemmt den photosynthetischen Elektronentransport in isolierten Chloroplasten an zwei Stellen. Die erste Hemmstelle, die durch eine kleinere Wirkstoffkonzentration charakterisiert ist, liegt in der Elektronentransportkette in der Nähe der Lichtreaktion II. Bei höherer Konzentration lässt sich eine zweite Hemmstelle in der Lichtreaktion I lokalisieren, wobei es sich um eine Hemmung des cyclischen Elektronentransportes oder um eine Entkopplung der cyclischen Phosphorylierung handelt. Die Proteinsynthese in Chloroplasten, gemessen am Leucin-Einbau wird durch Ioxynil nicht gehemmt, aber sie kann durch die Hemmung der cyclischen Phosphorylierung beeinflusst werden.

3. Beim Abbau von Ioxynil in Gerstenwurzeln treten über 20 Metaboliten auf. Das Herbizid erfährt Veränderungen im Sinne einer Hydrolyse der Nitrilgruppe mit nachfolgender Decarboxylierung, der partiellen oder totalen Dejodierung, der Hydroxylierung und schliesslich der Bildung von Glucosiden der Abbauprodukte. Von den gebildeten Metaboliten wurde Arbutin (Glucosid des Hydrochinon), Jodid, und das Glucosid des 2,6-Dijodhydrochinon identifiziert. Beim gebildeten Hauptmetaboliten dürfte es sich wahrscheinlich um das Glucosid des 2,4-Dijodresorcin handeln.

Summary

Responses of spinach and barley to the herbicide ioxynil

1. Barley grown in culture solution exhibits a ten-fold greater resistance to the herbicide 3,5-diiodo-4-hydroxybenzonnitrile (ioxynil) than spinach under the same conditions. This difference can be ascribed to the following factors: In spinach, active root uptake of the herbicide and translocation to the leaves takes place, while uptake in barley is slower and no translocation occurs. In addition, the absorbed

herbicide is not metabolised in spinach whereas active breakdown is observed in barley roots. The resistance shown by barley cannot be attributed to differences in susceptibility of the various metabolic systems to ioxynil since 50% inhibition of respiration in the roots and CO₂ fixation of isolated chloroplasts occurred at the same herbicide concentration for both spinach and barley.

By studying metabolic processes in ioxynil-treated spinach it was found that oxydative phosphorylation in the roots is the main process to be affected. Phosphate incorporation into nucleic acids of the leaves is influenced at the same time and displays equal sensitivity. The inhibition of photosynthesis (CO₂ fixation) is secondary to these effects.

2. Ioxynil inhibits the photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts at two sites. At low concentration one site of action can be located in the electron transport chain near photosystem II. At higher concentration the second site is located near photosystem I, inhibition of the cyclic electron transport or uncoupling of cyclic phosphorylation taking place. Protein synthesis in chloroplasts as measured by leucine incorporation is not inhibited by ioxynil but can be affected by inhibition of photophosphorylation.

3. The presence of at least 20 degradation products of ioxynil in barley roots is demonstrated. The herbicide undergoes changes involving hydrolysis of the nitrile group and subsequent decarboxylation, partial or complete deiodination, hydroxylation and finally formation of glucosides of the degradation products. Of the metabolites, arbutine (glucoside of hydroquinone), iodide and the glucoside of 2,6-diiodo-hydroquinone are identified and the probable structure of the main metabolite reported as the glucoside of 2,4-diiodo-resorcinol.

Literatur

- AMCHEM PRODUCTS Inc.: Technical data sheet. 30. Dezember (1963).
- ARNDT, F., KÖTTER, C.: Zur Selektivität von Phenmedipham als Nachauflaufherbizid in Beta-Rüben. *Weed Res.* 8, 259–271 (1968).
- ARNON, D. I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxylase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1–15 (1949).
- ARNON, D. I.: Photosynthetic activity of isolated chloroplasts. *Physiol. Rev.* 47, 317–358 (1967).
- ARNON, D. I., ALLEN, M. B., WHATLEY, F. R.: Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature (Lond.)* 174, 394–396 (1954).
- ARNON, D. I., WHATLEY, F. R., ALLEN, M. B.: Vitamin K as a cofactor of photosynthetic phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 16, 607–608 (1955).
- AUDUS, L. J.: The physiology and biochemistry of herbicides. Academic Press, London, 1964.
- AVRON, M., NEUMANN, J.: Photophosphorylation in chloroplasts. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 19, 137–160 (1968).
- BERG, S. S., NEWBERY, G.: The search for chemotherapeutic amidines. Part X. Substituted 4:4'-diamidino- ω -di-phenoxyalkanes and -diphenyl-ethers. *J. chem. Soc.* 1949, 642–648.
- BERÜTER, J., TEMPERLI, A. T.: Influence of prometryne and ioxynil on photosynthesis and nucleic acid metabolism in plants. *Experientia* 26, 600–601 (1970).
- BLOCK, P. Jr., POWELL, G.: The synthesis of 3', 5'-diiodothyronine. *J. Amer. chem. Soc.* 64, 1070 to 1074 (1942).
- BOWDEN, C. H., MACLAGAN, N. F.: The detection of thyroxine and related substances on paper chromatograms by the ceric sulfate-arsenious acid reaction. *Biochem. J.* 56, VII–VIII (1954).

- CARPENTER, K., COTTRELL, H. J., DE SILVA, W. H., HEYWOOD, B. J., LEEDS, W. G., RIVETT, K. F., SOUNDY, M. L.: Chemical and biological properties of two new herbicides – Ioxynil and Bromoxynil. *Weed Res.* 4, 175–195 (1964).
- CARPENTER, K., HEYWOOD, B. J.: Herbicidal action of 3,5-dihalogeno-4-hydroxy-benzonitriles. *Nature (Lond.)* 200, 28–29 (1963).
- CLAUSEN, T.: Measurement of ^{32}P activity in a liquid scintillation counter without the use of scintillator. *Anal. Biochem.* 22, 70–73 (1968).
- DAVIES, P. J., DRENNAN, D. S. N., FREYER, J. D., HOLLY, K.: The basis of the differential phytotoxicity of 4-hydroxy-3,5-diiodobenzonitrile. 2. Uptake and translocation. *Weed Res.* 8, 233–240 (1968).
- FERRARI, T. E., MORELAND, D. E.: Effect of 3,5-dihalogenated-4-hydroxybenzonitriles on the activity of mitochondria from white potato tubers. *Plant Physiol.* 44, 429–434 (1969).
- FRANK, R., SWITZER, C. M.: Effects of pyrazon on growth, photosynthesis and respiration. *Weed Sci.* 17, 344–348 (1969).
- FRIEND, J., OLSSON, R.: Inhibition of photosynthetic electron transport by ioxynil. *Nature (Lond.)* 214, 942–943 (1967).
- GROMET-ELHANAN, Z.: Two types of cyclic electron transport in isolated chloroplasts. In: METZNER, H. (ed.), *Progress in photosynthesis research*, vol. III, p. 1197–1202 (1969).
- HAGIHARA, B., LARDY, H. A.: A method for the separation of orthophosphate from other phosphate compounds. *J. Biol. Chem.* 235, 889–894 (1960).
- HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I.: The water-culture method for growing plants without soil. *California agricultural experiment station, Circular* 347, Jan. 1950.
- HURTER, J., BERÜTER, J., BOSSHARDT, H.-P.: Zur Resistenz der Graminee *Imperata cylindrica* L. gegenüber dem herbiziden Wirkstoff Simazin. *Experientia* 24, 217 (1968).
- JAGENDORF, A. T., AVRON, M.: Cofactors and rates of photosynthetic phosphorylation by spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 231, 277–290 (1958).
- KALBERER, P. P., BUCHANAN, B. B., ARNON, D. I.: Rates of photosynthesis by isolated chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 1542–1549 (1967).
- KALBERER, F., RUTSCHMANN, J.: Eine Schnellmethode zur Bestimmung von Tritium, Radiokohlenstoff und Radioschwefel in beliebigem organischen Probematerial mittels des Flüssigkeitsszintillationszählers. *Helv. chim. Acta* 14, 1956–1966 (1961).
- KEARNEY, P. C., KAUFMANN, D. D.: Degradation of herbicides. *Denker*, New York, 1969.
- KEISTER, D. L.: Indophenol dyes as catalysts and uncouplers of photophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 238, PC 2590–PC 2592 (1963).
- KERR, M. W., WAIN, R. L.: The uncoupling of oxidative phosphorylation in pea shoot mitochondria by 3,5-diiodo-4-hydroxybenzonitrile (ioxynil) and related compounds. *Ann. appl. Biol.* 54, 441–446 (1964).
- KERR, M. W., WAIN, R. L.: Inhibition of the ferricyanide-Hill reaction of isolated bean leaf chloroplasts by 3,5-diiodo-4-hydroxybenzonitrile (ioxynil) and related compounds. *Ann. appl. Biol.* 54, 447–450 (1964).
- KING, E. J.: The colorimetric determination of phosphorus. *Biochem. J.* 26, 292–297 (1932).
- KROGMANN, D. W., JAGENDORF, A. T., AVRON, M.: Uncouplers of spinach chloroplast photosynthetic phosphorylation. *Plant Physiol.* 34, 272–277 (1959).
- LOSADA, M., ARNON, D. I.: Enzyme systems in photosynthesis. In: H. F. LINSKENS, B. D. SANWALL, M. V. TRACEY (eds.), *Modern methods of plant analysis*, vol. 7, p. 592–596. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.
- LEGGET, J. E.: Salt absorption by plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 19, 333–346 (1968).
- MANN, J. D., JORDAN, L. S., DAY, B. E.: A survey of herbicides for their effect upon protein synthesis. *Plant Physiol.* 40, 840–843 (1965).
- MORELAND, D. E.: Mechanisms of action of herbicides. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 18, 365–386 (1967).
- MORELAND, D. E., MALHORTA, S. S., GRUENHAGEN, R. D., SHOKRAH, E. H.: Effects of herbicides on RNA and protein syntheses. *Weed Sci.* 17, 556–563 (1969).
- OORSCHOT VAN, J. L. P.: Influence of herbicides on photosynthetic activity and transpiration rate of intact plants. *Pestic. Sci.* 1, 33–37 (1970).

- PARKER, V. H.: Uncouplers of rat-liver mitochondrial oxydative phosphorylation. *Biochem. J.* 97, 658–662 (1965).
- PATON, D., SMITH, J. E.: The effect of 4-hydroxy-3,5-diiodobenzonitrile on CO₂ fixation, A.T.P. formation and N.A.D.P. reduction in chloroplasts of *Vicia faba* L. *Weed. Res.* 5, 75–77 (1965).
- PATON, D., SMITH, J. E.: Influence of ioxynil on the photo-reduction of endogenous plastoquinone by isolated chloroplasts of *Vicia faba* L. *Nature (Lond.)* 207, 1211–1212 (1965).
- PATON, D., SMITH, J. E.: The effect of sulphhydryl agents on the ioxynil-inhibited cyclic photophosphorylation in chloroplasts of *Vicia faba* L. *Experientia* 22, 734 (1966).
- RAMÍREZ, J. M., CAMPO, F. F. DEL, ARNON, D. I.: Photosynthetic phosphorylation as energy source for protein synthesis and carbon dioxide assimilation by chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 59, 606–612 (1968).
- SCHALL, C.: Einwirkung von Jod auf Phenolnatrium. *Chem. Ber.* 16, 1897–1902 (1883).
- SCHNEIDER, W. C.: Phosphorus compounds in animal tissues, I. Extraction and estimation of desoxy-pentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.* 161, 293–303 (1945).
- SEGAL, H. S., SUTHERLAND, M. L.: Ioxynil. In: G. ZWEIG (ed.), *Pesticides, plant growth regulators and food additives*, Vol. V, p. 428. Academic Press New York-London 1967.
- SEIFERT, R.: Dijodchinon und Dijodchinonchlorimid. *J. prakt. Chem.* [2] 28, 437–438 (1883).
- TREBST, A. V., TSUJIMOTO, H. Y., ARNON, D. I.: Separation of light and dark phases in the photosynthesis of isolated chloroplasts. *Nature (Lond.)* 182, 351–355 (1958).
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE: Report of the Secretary's commission on pesticides and their relationship to environmental health. Washington, D.C., 1969.
- VERLOOP, A., NIMMO, W. B.: Absorption, translocation and metabolism of dichlobenil in bean seedlings. *Weed Res.* 9, 357–370 (1969).
- VERNON, L. P., ZAUGG, W. S.: Photoreductions by fresh and aged chloroplasts: Requirement for ascorbate and 2,6-dichlorophenolindophenol with aged chloroplasts. *J. Biol. Chem.* 235, 2728 to 2733 (1960).
- WAIN, R. L.: 3,5-Dihalogeno-4-hydroxybenzonitriles: new herbicides with molluscicidal activity. *Nature (Lond.)* 200, 28 (1963).
- WAIN, R. L., BALAYANNIS, P.G., TAYLOR, H. F., ZAKI, M. A.: Selective herbicidal activity of iodides. *Nature (Lond.)* 209, 98 (1966).
- WEINBACH, E. C., GARBUS, J.: Structural changes in mitochondria induced by uncoupling reagents. *Biochem. J.* 106, 711–717 (1968).
- YOUNG, D. A. B.: Use of butyl acetate as a solvent for the extraction of trichloroacetic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 90, 178–179 (1964).
- ZAKI, M. A., TAYLOR, H. F., WAIN, R. L.: Studies with 3,5-diiodo-4-hydroxybenzonitrile (ioxynil) and related compounds in soils and plants. *Ann. appl. Biol.* 59, 481–491 (1967).