

Sektion für Pflanzenphysiologie

Autor(en): [s.n.]

Objekttyp: **AssociationNews**

Zeitschrift: **Verhandlungen der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft. Wissenschaftlicher und administrativer Teil = Actes de la Société Helvétique des Sciences Naturelles. Partie scientifique et administrative = Atti della Società Elvetica di Scienze Naturali**

Band (Jahr): **154 (1974)**

PDF erstellt am: **29.06.2024**

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

16. Sektion für Pflanzenphysiologie

Schweizerische Pflanzenphysiologische Gesellschaft
Société Suisse de Physiologie végétale
Società Svizzera di Fisiologia vegetale

Präsident: Prof. Dr P.-A. Siegenthaler, Laboratoire de physiologie végétale et biochimie, Université de Neuchâtel, 18, rue de Chantemerle, 2000 Neuchâtel

Sekretärin: Dr Lucia Graf, Laboratoire de physiologie végétale et biochimie, Université de Neuchâtel, 18, rue de Chantemerle, 2000 Neuchâtel

Wissenschaftliche Sitzung / Séance scientifique
Samstag, 12. Oktober / Samedi 12 octobre

1. Annemarie Kopp, U. Feller, K.H. Erismann (Pflanzenphysiologisches Institut, Universität Bern): Hat bei *Lemna minor* L. die Stickstoffquelle (Ammonium/Nitrat) einen Einfluss auf den Gehalt der Stärke und der freien Zucker?

Bei Gurkenpflanzen zeigen sich unter dem Einfluss des Ammoniumangebots in der Nährlösung Änderungen im Zuckerstoffwechsel (Matsumoto et al. 1968). Ammonium in steigender Konzentration bewirkt eine Anhäufung von Glukose; der Stärkegehalt ist reduziert. Die Ursache dafür liegt in einer Hemmung der Stärkesynthetase (Matsumoto et al. 1971). Breteler (1973) weist an Zuckerrüben nach, dass bei Ammoniumernährung der Gehalt an wasserlöslichen Kohlehydraten gegenüber demjenigen in Pflanzen mit Nitraternährung vermindert ist. Chlorellen zeigen eine erhöhte Aminosäuresynthese, wenn Ammonium die Stickstoffquelle darstellt (Kanazawa et al. 1970). Die verstärkte Abwanderung von C-Skeletten in die Aminosäuren geschieht auf Kosten der Saccharosesynthese, die Stärkesynthese ist nur geringfügig vermindert.

Lemna minor weist bei Ammoniumernährung einen höheren Gehalt an Gesamtstickstoff und an freien Aminosäuren auf als bei Nitraternährung (Feller, 1971). Es interessiert in diesem Zusammenhang die Frage, ob die regulatorische Wirkung der Stickstoffquelle auch in den Kohlehydraten zum Ausdruck kommt.

Lemna minor wurde auf einer modifizierten Nitrat- bzw. Ammonium-Nährlösung (Erismann, Finger 1968) angezogen. Die Stickstoffkonzentration von Nitrat und Ammonium betrug je 3,34 mMol. Das pH wurde, wo nicht speziell erwähnt, auf 6,5 eingestellt. 6tägige Kulturen wurden geerntet, gefriergetrocknet und analysiert. Der Nachweis der Stärke und der freien Zucker erfolgte mit Anthronreagens (Fluri 1959). Der Gesamtstickstoff wurde nach Bohley (1967) bestimmt. Der dort beschriebene photometrische Test wurde auch für die Bestimmung des Ammoniums

verwendet. Das Nitrat wurde nach Feller et al. (1971), der α -Aminostickstoff nach Cramer (1958) bestimmt.

Extreme Ernährungsbedingungen, wie Stickstoffmangel, erhöhte Molybdatkonzentration, pH-Änderungen und andere Modifikationen der Nährlösung bewirken bei *Lemna minor* eine Erniedrigung der Wachstumsrate und des Gesamtstickstoffgehaltes. Damit korreliert ist in der Regel eine Erhöhung des Stärkegehaltes. Diese kann sehr massiv sein und bis zu 400% des Kontrollwertes betragen. Dieses Verhalten zeigt sich sowohl bei Nitrat- als auch bei Ammoniumernährung der Pflanzen.

Tab. I Poolgrößen von Nitrat- bzw. Ammoniumleminen bei verschiedenen pH-Werten der Nährlösung

| pH-Werte der NL | Nitratleminen | | | Ammoniumleminen | | |
|---|---------------|------|------|-----------------|-------|------|
| | 6,1 | 7,1 | 7,7 | 4,7 | 6,2 | 7,0 |
| Wachstumsrate (q -100-Wert) | 2,5 | 2,8 | 2,9 | 2,5 | 2,9 | 2,9 |
| N _{tot} $\mu\text{g}/\text{mgTG}$ | 35,8 | 41,4 | 42,7 | 47,2 | 54,4 | 56,1 |
| Nitrat $\mu\text{g}/\text{mgTG}$ | 1,9 | 2,5 | 3,3 | – | – | – |
| NH ₄ $\mu\text{g}/\text{mgTG}$ | 1,5 | 1,3 | 1,2 | 1,3 | 2,2 | 2,3 |
| α -NH ₂ · N $\mu\text{g}/\text{mgTG}$ | 3,5 | 2,6 | 2,4 | 5,1 | 4,1 | 3,4 |
| freie Z $\mu\text{g}/\text{mgTG}$ | 53,4 | 35,7 | 33,5 | 57,8 | 55,6 | 37,4 |
| Stärke $\mu\text{g}/\text{mgTG}$ | 239,4 | 99,0 | 96,8 | 263,7 | 134,6 | 73,9 |

Tabelle I gibt einen Überblick über die Poolgrößen der interessierenden Inhaltsstoffe von Nitrat- und Ammoniumleminen bei verschiedenen pH-Werten der Nährlösung. Die Resultate sagen aus, dass bei unterschiedlichen pH-Werten die charakteristischen Unterschiede zwischen Nitrat- und Ammoniumleminen in bezug auf die Stickstoffverbindungen nicht verschwinden. Die Zuckerpools weisen bei Nitrat- und Ammoniumleminen ungefähr die gleiche Grösse auf. Die Grösse des Stärkepools wird durch die pH-Veränderungen am stärksten betroffen. Die Schwankungen sind beträchtlich, die Abhängigkeit bleibt jedoch bei Ammonium- und Nitratleminen im wesentlichen dieselbe: in beiden Fällen nimmt mit abnehmendem pH der Stärkegehalt zu.

Exogene Glukose wirkt sich sowohl auf den Glukose- als auch auf den Aminosäuregehalt aus. Der Einfluss auf die Aminosäuren ist grösser. Der Gehalt an freien Zuckern und Aminosäuren ist nach Glukosefütterung (2%ige Lösung) gegenüber der Kontrolle ohne Glukose bei Ammoniumleminen höher als bei Nitratleminen (162% und 239% gegenüber 140% und 175%). Der gleichzeitig erhöhte Stärkegehalt (etwa 350% bei beiden Lemnenkulturen) lässt vermuten, dass die Stärke als Auffangpool der überschüssigen Glukose dient.

Über eine allfällig direkte Wirkung der Stickstoffquelle Nitrat und Ammonium auf die Poolgrößen von Stärke und Zucker lässt sich nach den vorliegenden Resultaten nichts aussagen. Es geht jedoch deutlich aus den Resultaten hervor, dass andere Faktoren, insbesondere der pH-Wert, einen starken Einfluss ausüben. Da die Art der Stickstoffquelle sehr häufig die pH-Veränderung in der Nährlösung bestimmt, dürfte ihre Wirkung in erster Linie eine indirekte sein.

Literatur

- Bohley, P.: Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 348, 100 (1967).
Breteler, H.: Neth.J.agric.Sci. 21, 227 (1973).
Cramer, F.: Papierchromatographie, Verlag Chemie 1958, Weinheim (s. 102).
Erismann, K. H./Finger, A.: Ber.Schweiz.Bot.Ges. 78, 5 (1968).
Feller, U./Erismann, K. H.: Verh.Schweiz.Naturforsch.Ges. 71, 96 (1971).
Feller, U./Bauer, A./Erismann, K. H.: Schweiz.Landw.Forschung 10, 249 (1971).
Fluri, R.: Arch.Mikrobiol. 33, 195 (1959).
Kanazawa, T./Kirk, M. R./Bassham, J. A.: BBA 205, 401 (1970).
Matsumoto, H./Wakiuchi, N./Takahashi: Physiol.Plant. 21, 1210 (1968).
Matsumoto, H./Wakiuchi, N./Takahashi: Physiol.Plant. 24, 102 (1971).

2. H. Fankhauser, Dr. Chr. Brunold, Prof. Dr. K.H. Erismann (Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Bern): Der Einfluss von SO₂ im Bereich der Grenzkonzentration auf die Netto-Stoffproduktion bei *Lemna minor* L.

Eine ganze Anzahl recht verschiedenartiger phytotoxischer Eigenschaften des als Verbrennungsprodukt entstehenden SO₂ sind von verschiedenen Autoren beschrieben worden, wobei sich nur schwer allgemeingültige Gesetzmässigkeiten in der Wirkung erkennen lassen. In vielen Arbeiten wurden dabei SO₂-Konzentrationen verwendet, die weit über der in der Atmosphäre herrschenden Schadgaskonzentration liegen. Es schien uns daher angebracht, vorerst die von der Eidg. Kommission für Lufthygiene festgelegten Immissionsgrenzwerte für SO₂ (für den Sommer: 0,3 ppm als Halbstundenmittel, 0,2 ppm als Tagesmittel; für den Winter: 0,5 bzw. 0,3 ppm) bei unserem Testorganismus *Lemna minor* L. in bezug auf die Netto-Stoffproduktion zu prüfen, um dann später in spezielleren Untersuchungen nach dem Wirkungsmechanismus zu forschen. Als Testgrößen dienten das Wachstum, charakterisiert durch die Wachstumsrate, das mittlere Trockengewicht pro Glied und die Gliedergrösse, im weiteren der Protein- und der Stärkegehalt sowie die Chlorophyllkonzentration.

Die Versuchspflanzen wurden über eine Zeit von 8 Wochen auf der von Erismann und Brunold [1] beschriebenen Kulturanlage unter standardisierten Bedingungen konstanten SO₂-Konzentrationen von 0, 0,15, 0,3 und 0,6 ppm ausgesetzt. Kulturbedingungen: Dauerbeleuchtung von oben 4500 ± 100 Lux; Nährlösung E-NO₃⁻ pH 6,4, modifiziert nach Erismann und Finger [2]; Durchflussrate 40 ml / h / Kulturgefäss; Begasung mit Luft mit etwa 0,03% CO₂, Belüftungsrate mindestens 20 l / h / Kul-

turgefäss; SO₂-Konzentration: SO₂-freie Luft (Kontrolle), 0,15, 0,3, 0,6 ppm; Raumtemperatur 24–25 °C; Inoculum ca. 20 Glieder. Im Laufe der SO₂-Inkubationszeit wurden die einzelnen Testgrößen mehrmals untersucht. Die Wachstumsmessungen wurden wie in [1] beschrieben durchgeführt. Der Proteingehalt wurde mit der Biuret-Reaktion nach Deveny und Gergely [3] sowie als Kontrolle mit der Mikrokjeldahl-Methode nach Bohley [4] bestimmt. Die Stärkebestimmung erfolgte enzymatisch nach einer Arbeitsvorschrift von Boehringer [5]. Die Chlorophyllkonzentration wurde nach Arnon [6] bestimmt.

Die folgenden Resultate stellen stets Mittelwerte von 6 Parallelen dar. Bei SO₂-Konzentrationen von 0,15 und 0,3 ppm lassen sich die Wachstumsraten nicht signifikant von den Kontrollen unterscheiden. Bei 0,6 ppm SO₂ erfolgte nach rund 2 Wochen eine Depression der Wachstumsrate um 25%. Die Rate stieg dann in der Zeit von 4 Wochen wieder auf das Niveau der Kontrolle an, was für eine Adaptation an die SO₂-Behandlung spricht.

Die Bestimmung des mittleren Trockengewichts pro Glied ergab keine eindeutigen Unterschiede zwischen Kontroll- und SO₂-inkubierten Pflanzen. Dagegen zeigte die Größenbestimmung der Glieder eine statistisch gesicherte Verschiebung zu kleineren Gliederdurchmessern um eine Größenklasse von 0,25 mm. Die dadurch leicht verringerte Gliederfläche vermag keine merkbare Änderung im Trockengewicht pro Glied zu bewirken.

Das SO₂ scheint keinen Einfluss auf den Proteingehalt auszuüben, wurden doch bei Kontroll- wie auch bei SO₂-behandelten Pflanzen Proteingehalte um 25% des Trockenmaterials gemessen.

Die Resultate der Stärkebestimmung deuten auf eine Stoffwechsellage hin, indem bei 0,3 und 0,6 ppm SO₂ der Stärkegehalt im Vergleich zu den Kontrollen sofort um mindestens 20% erniedrigt war und in der Folge auf diesem Niveau blieb, während er bei 0,15 ppm erst nach längerer Zeit auf denselben Wert absank.

In der Chlorophyllkonzentration können zwischen Kontrollen und SO₂-Behandlungen keine Unterschiede gesichert werden.

Zusammenfassend könnte man sagen, dass das SO₂ auch unterhalb der tolerierten Immissionsgrenzwerte eine Wirkung auf die Stoffproduktion bei *Lemna minor* ausübt. Allerdings werden keine akuten Schädigungen hervorgerufen, es stellt sich vielmehr ein neuer steady state ein, was aus den konstant bleibenden Werten in Wachstum und Stoffproduktion hervorgeht.

Literatur

1. Erismann, K.H., und Brunold, Chr., 1973: Ber.Schweiz.Bot.Ges. 83 (3), 213–222.
2. Erismann, K.H., und Finger, A., 1968: Ber.Schweiz.Bot.Ges. 78, 5–15.
3. Deveny, T., und Gergely, J., 1968: Analyt.Methoden zur Untersuchung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen, Akad.Verlagsgesellschaft, Frankfurt a. M.
4. Bohley, P., 1967: Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 348, 100–110.
5. Boehringer, Mannheim GmbH, Biochemica, 1971: Enzymatische Analysen für die Lebensmittelchemie.
6. Arnon, D.J., 1949: Plant Physiol. 24, 1.

3. B. Stöckli (Universität Bern): Zur Thymidinphosphorylierung bei *Lemna minor* L.
4. **Dr. Lucia Graf (Université de Neuchâtel, Laboratoire de Physiologie Végétale et Biochimie): Effekte spezifischer Immunsereen und Normalseren auf die verschiedenen Aktivitäten der Nitratreduktase aus Spinat (*Spinacea oleracea* L.) und Anwendung einer immunologischen Methode zum Nachweis von katalytisch inaktivem Enzym-Protein**

Zusammenfassung

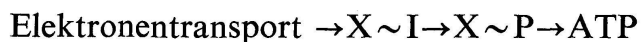
Immunsereen, gewonnen gegen partiell gereinigte Präparate von Nitratreduktase aus Spinatblättern, enthalten einerseits spezifische Antikörper, welche die NADH-Aktivität und die Benzylviologen-Aktivität der Spinat-Nitratreduktase inaktivieren, andererseits aber auch Antikörper, die vor allem die Benzylviologen-Aktivität stimulieren. Normalseren stimulieren beide Aktivitäten, vor allem aber die Benzylviologen-Aktivität, die in Abhängigkeit von der Serumkonzentration 4- bis 5fach erhöht wird. Extrakte aus Molybdän-Mangelpflanzen wurden durch Reihentitrationen mit spezifischen anti-Nitratreduktase-Seren auf das Vorhandensein von katalytisch inaktivem Nitratreduktase-Apoprotein geprüft.

Literatur

- Notton, B.A./Graf, L./Hewitt, E.J./Povey, R.C.: The Role of Molybdenum in the Synthesis of Nitrate Reductase in Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *Botryris* L.) and Spinach (*Spinacea oleracea* L.). *Biochim. Biophys. Acta* 364, 45–58 (1974).
- Graf, L./Notton, B.A./Hewitt, E.J.: The effects of immune and non-immune rabbit sera on the various activities of spinach (*Spinacea oleracea* L.) nitrate reductase. *Plant Science Letters* (im Druck).
- Graf, L./Notton, B.A./Hewitt, E.J.: Serological estimation of spinach nitrate reductase. *Phytochemistry* (im Druck).

5. **R. Bachofen (Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich): Fest gebundenes ATP als Intermediärprodukt der elektronentransportgekoppelten ATP-Bildung**

Obwohl sehr intensiv an der Aufklärung des Mechanismus der elektronentransportgekoppelten Phosphorylierung gearbeitet wird, hat das vor längerer Zeit aufgestellte Schema



kaum Modifikationen erfahren.

Der Vorläufer von ATP, das energiereiche Zwischenprodukt $X \sim P$, liess sich zwar kinetisch demonstrieren, eine chemische Isolierung dagegen gelang nie. Das 1964 zur Diskussion stehende Phosphohistidin, das verschiedene kinetische Kriterien eines Vorläufers erfüllte, musste bald wieder fallengelassen werden. In den vergangenen 10 Jahren konzentrierte

man sich mehr auf $X \sim I$, das nicht phosphorylierte, energiereiche Zwischenprodukt. Heute stehen 3 Hypothesen für die Natur dieses $X \sim I$ zur Wahl, die chemische, die chemiosmotische und die konformative Hypothese. Nach der ersten soll $X \sim I$ eine chemisch definierbare Verbindung, nach der zweiten ein elektrochemisches Potential quer zur Organellenmembran und nach der letzten eine energiereiche Konformation einer Membrankomponente sein. Über die Art der Kopplung dieser Vorstufe $X \sim I$ mit dem Einbau von Phosphat zu $X \sim P$ bestehen kaum konkrete Vorstellungen.

Vor kurzem hat sich in verschiedenen Laboratorien an verschiedenen energieumsetzenden Membranen ergeben, dass als direkter Vorläufer des bei der Phosphorylierung frei werdenden ATP, d. h. als $X \sim P$, eine fest an die Membran gebundene Form von ATP wahrscheinlich ist. Dessen Extraktion ist nur unter drastischen Bedingungen möglich; normales Abtöten der Zellorganellen mit verdünnten Säuren genügt nicht zur Solubilisierung des fest gebundenen ATP.

Die folgenden Daten, erhalten an Membranen photosynthetischer Organismen (Chromatophoren von *Rhodospirillum rubrum* und Spinatchloroplasten), sollen die Eigenschaften dieses fest gebundenen ATP demonstrieren. Ähnliche Beobachtungen sind an Mitochondrien und Membranen heterotropher Bakterien gemacht worden.

Die Markierung des fest gebundenen ATP mit Phosphat geschieht sowohl im Licht wie im Dunkeln; mit Puffer oder Säure ablösbares ATP dagegen wird nur bei Energiezufuhr synthetisiert. Von besonderem Interesse ist eine teilweise Unabhängigkeit der Bildung sowohl der säurelöslichen wie des festgebundenen ATP von der Gegenwart von Entkopplern und Hemmstoffen des Energietransfers. Agentien, welche den Kopplungsfaktor entfernen oder modifizieren wie EDTA oder NEM, reduzieren dagegen die Menge des vorhandenen gebundenen ATP in gleichem Umfang wie die Phosphorylierungsaktivität.

Die Kapazität, in einer der Belichtung anschließenden Dunkelreaktion in Gegenwart von ADP freies ATP zu bilden, ist eng korreliert mit der Menge des zuvor in der Membran vorhandenen fest gebundenen ATP, und während der Bildung des freien ATP in Gegenwart von ADP nimmt der Gehalt der Membranen an fest gebundenem ATP ab.

Die Versuche zeigen damit, dass die Synthese von festgebundenem ATP mit geringem oder sogar ohne Aufwand an Energie von der Elektronentransportkette abläuft und dass Entkoppler und Hemmstoffe des Energietransfers vor allem die Umsetzung des gebundenen ATP in dessen freie Form blockieren. Isotopenkonzentrierungsexperimente zeigen allerdings, dass es sich beim letzteren Vorgang nicht um eine einfache Ablösung des festgebundenen ATP von der Membran handelt, sondern dass das festgebundene ATP hydrolysiert und die dabei frei werdende Energie zur Synthese des säure- und pufferlöslichen ATP genutzt wird [1-4]. Zu ähnlichen Vorstellungen für diesen letzten Schritt der Phosphorylierung gelangte man unabhängig davon auch aufgrund von Experimenten mit Analogen von Adenininnukleotiden [5].

Obwohl mit dem von uns vorgeschlagenen Modell noch nicht alle experimentellen Befunde sauber erklärt werden können, lassen sich die gemachten Beobachtungen klarer deuten als mit den Modellen von Moudrianakis [6], Boyer [7] oder Slater [8].

Literatur

1. Bachofen, R./Beyeler, W./Dahl, J.S./Lutz, H.U./Pflugshaupt, Ch.: In Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation, G.F.Azzone, M.E.Klingenberg, E.Quagliariello und N.Siliprandi (eds), North-Holland, Amsterdam, 1974, p. 61.
2. Lutz, H.U./Dahl, J.S./Bachofen, R.: Biochim.Biophys.Acta 347, 359, 1974.
3. Beyeler, W./Lutz, H.U./Bachofen, R.: J.Bioenergetics, im Druck.
4. Pflugshaupt, Ch./Bachofen, R.: unveröffentlicht.
5. Horak, A./Zalik, S.: Nature 249, 858, 1974.
6. Roy, H./Moudrianakis, E.N.: Proc.Nat.Acad.Sci.USA 68, 2720, 1971.
7. Boyer, P.D.: Biochim.Biophys.Acta, im Druck.
8. Slater, E.C./Rosing, J./Harris, D.A./Van de Stadt, R.J./Kemp, A.: In Membrane Proteins in Transport and Phosphorylation, G.F.Azzone, M.E.Klingenberg, E.Quagliariello und N.Siliprandi (eds), North-Holland, Amsterdam, 1974, p. 137.

6. F. Depéry et P.A. Siegenthaler (Laboratoire de physiologie végétale, Institut de Botanique, Université de Neuchâtel): Influence des acides gras sur le pH interne des thylacoïdes et sur le transport de protons à travers la membrane

1. Introduction

Le pH a une influence déterminante sur les activités photochimiques des chloroplastes, en particulier sur la photophosphorylation et sur les divers transports d'électrons dans la chaîne photosynthétique. Récemment, nous avons démontré [1] qu'en présence d'acides gras non saturés en C₁₈, le pH externe optimum est déplacé vers l'acidité. Par exemple, la photoréduction du ferricyanure par des chloroplastes isolés est optimale à un pH externe de 8,5; l'addition d'acide gras provoque un déplacement de pH de 1 à 2 unités vers l'acidité.

Ce phénomène nous a fait pressentir l'importance du pH interne dans ces diverses conditions [1, 2]. En effet, d'après la théorie chimio-osmotique de Mitchell, le flux d'électrons initié par la lumière entraîne un gradient de protons à travers la membrane qui acidifie l'intérieur du thylacoïde créant ainsi les conditions optimales pour le transport d'électrons.

Les acides gras empêchent l'établissement des conditions optimales du flux d'électrons en modifiant le mouvement de protons de façon telle que l'intérieur du thylacoïde s'alcalinise, condition défavorable au transport d'électrons [2].

La détermination précise du pH interne ne peut se faire d'après la méthode de Neumann et Jagendorf [3] en estimant la quantité de protons incorporés par la mesure de la variation du pH externe, car il existe à l'intérieur des thylacoïdes une grande capacité tampon qui masque le véritable pH interne.

Dans ce travail, nous avons estimé le pH interne en utilisant la méthode préconisée par Schuldiner et al. [4], qui est basée sur la détermination, par fluorimétrie, de l'incorporation d'une amine fluorescente dans les thylacoïdes. En accord avec notre hypothèse [1, 2], nous démontrons que l'addition d'acides gras provoque une diminution du ΔpH et une augmentation du pH interne. Cette observation est mise en relation avec les résultats obtenus auparavant sur le transport d'électrons [1].

2. Matériel et Méthode

Des chloroplastes entiers, c'est-à-dire ayant subi un choc osmotique dans un milieu HEPES-saccharose (pH 7,6), sont obtenus à partir de feuilles d'épinard selon la méthode utilisée précédemment [5, 6]. Le mélange réactionnel contient 30 mM Tricine-Maléate (pH 7) ou Tricine-Glycine (pH 8-9), 40 mM NaCl, 0,5% éthanol ou de l'acide linoléique à diverses concentrations, 0,8 μM 9-aminoacridine et 20 μg de chlorophylle par ml.

La fluorescence est mesurée à l'aide d'un fluorimètre Perkin-Elmer type 204, légèrement modifié. L'excitation de l'acridine se fait avec un filtre Klett 42 (370-440 nm); l'émission de la fluorescence est recueillie à 90°, à 505 nm. La lumière actinique (10^{-5} à 10^{-6} $\text{erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$) est définie par une lampe halogène et un filtre rouge (Corning CS 260).

3. Relation entre le ΔpH et le quenching de la fluorescence de l'acridine

L'amine fluorescente est la 9-aminoacridine (A) caractérisée par deux fonctions amines ayant des pK respectifs de -2 et de 10. Au pH physiologique, seules les formes non protonée A et protonée AH^+ sont présentes dans le milieu [4]. L'amine ne peut traverser la membrane du thylacoïde que sous forme non chargée. D'après Schuldiner et al. [4], nous avons la relation suivante:

$$[\text{A}]_{\text{T, int}} / [\text{A}]_{\text{T, ext}} = [\text{H}^+]_{\text{int}} / [\text{H}^+]_{\text{ext}} \quad (1)$$

qui établit un rapport direct entre les concentrations de l'amine totale et des protons à l'intérieur et à l'extérieur du thylacoïde.

L'amine pénètre dans le volume osmotique défini par Rottenberg et al. [7]. La fraction de ce volume par rapport au volume total est appelé V. Dans nos conditions expérimentales, V est égal à $6,5 \cdot 10^{-4}$.

Dans le milieu réactionnel, la fluorescence de l'amine est de 100% par définition. L'amine qui entre dans le compartiment interne du thylacoïde ne peut plus fluorescer, ce qui entraîne une extinction rapide (ou quenching Q) de la fluorescence de l'acridine (par exemple Q est de 36% à un pH externe de 8,0 en présence de ferricyanure). Cette extinction est proportionnelle à la quantité d'amine entrée, c'est-à-dire au mouvement de protons à travers la membrane (voir relation 1) ce qui permet d'écrire [4]:

$$\Delta\text{pH} = \log \frac{Q}{1-Q} \cdot \frac{1}{V} \quad (2)$$

où le ΔpH est une fonction logarithmique de Q et de l'inverse de V . Un quenching de 36% correspond par exemple à un ΔpH de 2,9: si le pH externe est 8,0, le pH interne est donc égal à 5,1.

Le phénomène du quenching est bien une expression du phénomène physiologique qui se déroule à la lumière. La lumière provoque une acidification du compartiment interne du thylacoïde dont l'entrée de l'amine A et par conséquent la diminution de la fluorescence en sont l'expression. A l'obscurité, le pH interne tend à rejoindre le pH externe; l'amine ressort et la fluorescence prend à nouveau sa valeur initiale de 100%.

4. Résultats et Discussion

Le tableau I illustre la relation entre le pH externe et le pH interne des thylacoïdes en présence ou non d'acide linoléique. Une diminution du pH externe provoque une diminution du pH interne sous l'action de la lumière. Par exemple, pour les témoins, c'est-à-dire en absence d'acides gras, un quenching de 25% à un pH externe de 9,0 correspond à un ΔpH de 2,7 et à un pH interne de 6,3; un quenching de 12% à un pH externe de 8,0 correspond à un ΔpH de 2,3 et à un pH interne de 5,7.

L'addition d'acide linoléique aux concentrations indiquées provoque une augmentation du pH interne (correspondant à une diminution du ΔpH). Par exemple, en présence de 50 μM d'acide linoléique, le pH interne est égal à 9,0 si le pH externe est 9,0 et 6,5 si le pH externe est 8,0.

Dans nos conditions, le pH externe optimum pour le transport d'électrons est voisin de 9,0 correspondant à un pH interne optimum de 6,3. L'augmentation du pH interne due aux acides gras défavorise donc le transport d'électrons. Pour obtenir les conditions optimales au transport d'électrons en présence d'acides gras, il est nécessaire d'abaisser le pH interne en acidifiant le mélange réactionnel. En effet, le tableau I montre qu'à des concentrations croissantes d'acide linoléique, le pH interne de 6,3 ne peut être maintenu que dans la mesure où le pH externe est abaissé (voir les astérisques dans le tableau I).

Notons qu'en présence d'un accepteur d'électrons, on observe des variations de pH internes similaires, caractérisées cependant par des pH internes plus acides. Par exemple, en présence de ferricyanure à un pH externe de 8,5, le pH interne est de 5,3.

Tab. I pH interne du thylacoïde en fonction du pH externe et de concentrations croissantes d'acide linoléique

| pH externe | pH interne | | | |
|------------|--|------|------|------|
| | Concentrations d'acide linoléique, μM | | | |
| | 0 | 20 | 40 | 50 |
| 9,0 | 6,3* | 7,8 | 9,0 | 9,0 |
| 8,5 | 6,0 | 6,3* | 7,1 | 8,5 |
| 8,0 | 5,7 | 5,8 | 6,3* | 6,5 |
| 7,0 | 5,3 | 5,5 | 5,9 | 6,0* |

Ces résultats préliminaires semblent indiquer qu'en présence d'acides gras, la membrane perd son intégrité structurale et devient beaucoup plus perméable aux ions et en particulier aux protons [1, 2]. Les acides gras interagissent avec la membrane en créant des modifications (des « pores » par exemple) telles que le pH externe doit être abaissé pour maintenir constant un pH interne favorable au flux d'électrons. Ces résultats pourraient expliquer le déplacement vers l'acidité du pH optimum du transport d'électrons en présence d'acides gras libres [1].

Ce travail a été réalisé grâce à l'appui financier du Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (contrat n° 3.2470.74). Le fluorimètre nous a été aimablement prêté par le Prof. A. Burger du laboratoire d'hydrogéologie de l'Université de Neuchâtel.

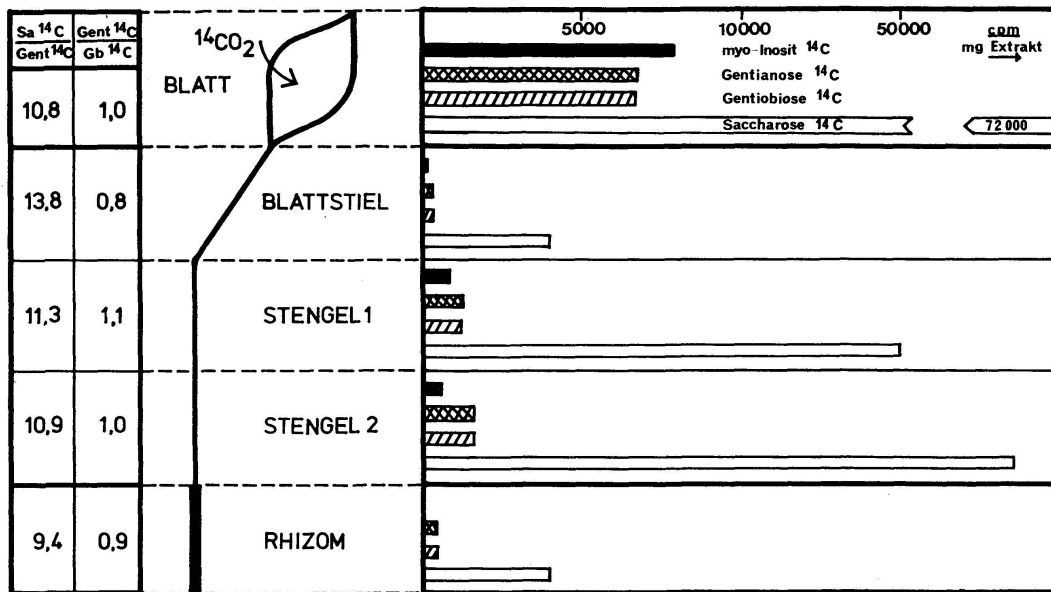
Références

1. Siegenthaler, P. A. (1973): *Biochim. Biophys. Acta* 305, 153.
2. Siegenthaler, P. A. (1972): *Actes Soc. Helv. Sci. Nat.*, p. 159.
3. Neumann, J./Jagendorf, A. T. (1965): *Biochim. Biophys. Acta* 109, 383.
4. Schuldiner, S./Rottenberg, H./Avron, M. (1972): *Eur. J. Biochem.* 25, 64.
5. Siegenthaler, P. A./Horakova, J. (1974): III^e Congrès International de Photosynthèse, Rehovot (Israël), M. Avron (ed). Elsevier Sci. Publ. Company, Amsterdam, The Netherlands, 1974, p. 655.
6. Kalberer, P. P./Buchanan, B. B./Arnon, D. I. (1967): *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 57, 1542.
7. Rottenberg, H./Grunwald, T./Avron, M. (1972): *Eur. J. Biochem.* 25, 54.
7. K. H. Erismann (Universität Bern): Regulation der Photosynthese-induktionsprozesse bei *Lemna minor L.*
8. H. Meier/G. Franz (Universität de Fribourg): Über den Mannose-metabolismus bei der Mobilisierung von Reservemannanen.
9. **F. Keller, G. Franz (Institut für Botanische Biologie und Phytochemie der Universität Freiburg i. Ue.): Bildung und Transport des Trisaccharides Gentianose in *Gentiana lutea L.***

Gentianose (O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- α -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fructofuranosid) kommt in Blättern und unterirdischen Speicherorganen von vielen Arten der Gattungen *Gentiana* und *Swertia* vor [2]. Bis jetzt standen nur Angaben über perennierende Pflanzen zur Verfügung. Um weitere Auskunft über die chemotaxonomische Verbreitung der Gentianose und ihre Bedeutung als Reservezucker zu erhalten, wurden die Untersuchungen auch auf annuelle *Gentiana*-Arten ausgedehnt. In Blättern, Stengeln und Wurzeln von *Gentiana utriculosa L.* konnte die Anwesenheit von Gentianose und Gentiobiose bestätigt werden, während diese Zucker bei *Gentiana ramosa Hegetschw.* und *Gentiana campestris L.* chromatographisch nicht nachgewiesen werden konnten.

Diese beiden «gentianosefreien» Arten werden von den Systematikern einer separaten Sektion (*Endotricha* Koel.) zugeordnet. Erst empfindlichere Analysenmethoden und ausgedehntere Untersuchungen werden über die Wichtigkeit der Gentianose als chemotaxonomisches Merkmal definitiv entscheiden.

Franz u. Meier (1972) zeigten in Fütterungsversuchen mit markierten Zuckern, dass Gentianose *in vivo* durch Anlagerung eines Glukoserestes an Saccharose gebildet werden kann. Um besseren Einblick in die Biosynthese der Gentianose zu erhalten, wurden durch Fütterung an Blattstückchen zwei weitere mögliche Synthesewege getestet: 1. myo-Inosit, das in der Raffinosefamilie in Form des Galaktinols (O- α -D-Galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 1)-myo-Inosit) als Donor von Galaktose zur Raffinose- und Stachyosebildung dient; 2. Gentiobiose, da bei *Gentiana lutea* L. nach $^{14}\text{CO}_2$ -Photosynthese Gentiobiose- ^{14}C stets vor Gentianose- ^{14}C aufzu-



Translokation von ^{14}C -Photoassimilaten in *Gentiana lutea* L. (relative Aktivitäten nach 1 h CO_2 -Fütterung, Distanz markiertes Blatt-Rhizom = 30 cm)

treten scheint. Markiertes myo-Inosit wurde in den Blättern nicht umgesetzt. Nach Fütterung mit Gentiobiose- ^{14}C an Blättern von *Gentiana lutea* L. wurden Gentianose- ^{14}C und geringe Mengen von Saccharose- ^{14}C gefunden. Ähnliche Resultate konnten bei Untersuchungen an *Gentiana Kochiana* L. erhalten werden. Um daraus Rückschlüsse ziehen zu können, muss die Markierungsverteilung in den verschiedenen Zuckern der neu gebildeten Gentianose- ^{14}C und Saccharose- ^{14}C untersucht werden.

Der intrazelluläre Syntheseort der Gentianose scheint nicht in den Chloroplasten zu liegen, wie ursprünglich angenommen wurde. Nach $^{14}\text{CO}_2$ -Photosynthese konnte in den Chloroplasten nach wässriger Isolation derselben [1] keine Gentianose- ^{14}C nachgewiesen werden, wohl aber im restlichen Cytoplasma. Dieses Resultat steht in Einklang mit

neueren Befunden, dass auch Saccharose, die bei der Synthese von Gentianose beteiligt sein kann, ebenfalls ausserhalb der Chloroplasten gebildet wird [3]. Da die Chloroplastenmembran für das Disaccharid Saccharose nicht permeabel ist [4], wird sie es noch weniger für das Trisaccharid Gentianose sein. Um eine mögliche Auswaschung von hypothetischer Chloroplasten-Gentianose während der Chloroplastenisolation völlig ausschliessen zu können, müssen die Resultate mit solchen einer nichtwässrigen Methode verglichen werden.

Gentianose kann in den Blättern synthetisiert werden, wogegen in Rhizom und Wurzel nach Fütterung mit Glukose- ^{14}C und Saccharose- ^{14}C keine markierte Gentianose auftritt [2]. Im folgenden soll daher von Untersuchungen über die aus den Blättern basipetal transportierten Assimilate berichtet werden.

Blätter von *Gentiana lutea* L. wurden während 60 min mit $^{14}\text{CO}_2$ begast. Anschliessend wurden die Pflanzen in Blatt, Blattstiel, Stengel und Rhizom aufgeteilt und die Teile wie bei [2] weiter verarbeitet.

Danach ist der Haupttransportzucker Saccharose- ^{14}C (Fig. 1). Im markierten Blatt, in Blattstiel, Stengel und Rhizom treten aber auch beträchtliche Mengen von Gentianose- ^{14}C und Gentiobiose- ^{14}C auf. Da sich das Verhältnis Gentianose- ^{14}C /Gentiobiose- ^{14}C im Verlauf des basipetalen Transportes nicht ändert und zudem etwa gleich gross ist wie im markierten Blatt, wird angenommen, dass Gentiobiose nicht das Spaltprodukt von Gentianose ist [2]. Diese Annahme wird noch dadurch bekräftigt, dass bei *Gentiana lutea* L. nach $^{14}\text{CO}_2$ -Photosynthese Gentiobiose- ^{14}C zeitlich vor Gentianose- ^{14}C aufzutreten scheint.

Das Verhältnis Saccharose- ^{14}C /Gentianose- ^{14}C nimmt rhizomwärts leicht ab. Diese Abnahme wird um so grösser, je länger die Aufenthaltsdauer der Assimilate im Rhizom wird. Im Rhizom nehmen Saccharose- ^{14}C und Gentiobiose- ^{14}C nach längerer Aufenthaltsdauer ab, Gentianose- ^{14}C nimmt zu. Falls die Zunahme der Gentianose auf Kosten von Saccharose und Gentiobiose erfolgt, wären folgende Konsequenzen denkbar:

1. Gentianose kann auch im Rhizom gebildet werden. 2. Neben Saccharose ist Gentiobiose an der Biosynthese von Gentianose beteiligt. An Rhizome gefütterte Gentiobiose- ^{14}C und Saccharose- ^{14}C wurden jedoch nicht zu Gentianose- ^{14}C umgesetzt. Ob dieser Widerspruch nur an der Unzulänglichkeit der Applikationsmethode liegt, werden weitere Versuche zeigen müssen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in Blattstielen und Stengeln von *Gentiana lutea* L. neben Saccharose- ^{14}C auch Gentianose- ^{14}C und Gentiobiose- ^{14}C basipetal transportiert werden. Vorläufig kann das Rhizom als weiterer Syntheseort (neben den Blättern) nicht ausgeschlossen werden.

Literatur

1. Cockburn, W./Walker, D.A./Baldry, C.W.: Biochem.J. 107, 89 (1968).
2. Franz, G./Meier, H.: Z.Pflanzenphysiol. 66, 433 (1972).
3. Heber, U.: Ann.Rev.Plant Physiol. 25, 393 (1974).
4. Heldt, H.W./Sauer, F.: Biochim.Biophys.Acta 234, 83 (1971).