

# Untersuchungen zur lichtabhängigen Phosphorylierung

IV. Die Wirkung des Lichtes auf die  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung bei chlorophyllfreien Pflanzenzellen und -Geweben

Von WILHELM SIMONIS und MARIA EHRENBERG

Aus dem Botanischen Institut der Tierärztlichen Hochschule, Hannover

(Z. Naturforschg. **12 b**, 156—163 [1957]; eingegangen am 2. November 1956)

Bei chlorophyllfreien Zellen (Wurzeln von *Hordeum* sowie *Saccharomyces cerevisiae*) wurde die  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung und Verteilung in verschiedene Fraktionen in Abhängigkeit von Licht und Dunkelheit untersucht. Bei beiden Objekten zeigte sich eine durch Licht verursachte Förderung bzw. Veränderung der  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme, die sich in allen Fraktionen widerspiegelt. Die möglichen Ursachen der hier nachgewiesenen „photosensibilisierten Phosphorylierung“ und „lichtabhängigen P-Aufnahme“ sowie die Konsequenzen, die sich aus ihrem Vorhandensein für die Beurteilung der licht-abhängigen Phosphorylierung bei chlorophyllhaltigen Zellen ergeben, werden diskutiert.

Bei unseren Untersuchungen zur lichtabhängigen Phosphorylierung<sup>1</sup> erschien es uns bereits seit langerer Zeit wünschenswert, zu prüfen, ob die mit Hilfe der Einlagerung von  $^{32}\text{P}$  in phosphorylierte Verbindungen pflanzlicher Zellen (*Helodea*-Blätter; *Ankistrodesmus*) festgestellte Änderung des Phosphat-Stoffwechsels im Licht lediglich bei chlorophyllhaltigen Zellen auftritt bzw. ob diese bei chlorophyllfreien Zellen fehlt. Hierdurch wäre der sichere Nachweis einer besonderen, nur im Zusammenhang mit der Photosynthese auftretenden Phosphorylierung auf einfache Weise möglich. Wir untersuchten deshalb die Beeinflussung der Phosphorylierungs-Prozesse chlorophyllfreier pflanzlicher Zellen und Gewebe durch Belichtung. Es wurde mit Bäckerhefe und mit isolierten Wurzelstücken von Gerste (*Hordeum vulgare*) gearbeitet. Dabei zeigte sich aber sehr bald, daß durch Belichtung auch bei chlorophyllfreien Zellen Verschiebungen in der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung auftreten, die unter Umständen ein erhebliches Ausmaß erreichen.

## Methodik

### Pflanzenmaterial und Anzucht

Als Versuchsobjekt wurden 1. die Wurzeln von Gerstenkeimlingen und 2. Bäckerhefe benutzt.

1. Anzucht von Gerstenkeimlingen (*Hordeum vulgare*, Sorte „Firebecks III“): Die Samen wurden nach der von AUDUS und GARRARD<sup>2</sup> angegebenen Methode sterilisiert: sie wurden 2 Min. in 80-proz. Alkohol und dann 2 Min. in 0,2-proz.  $\text{HgCl}_2$  getauft, danach zur Entfernung noch anhaftender Hg-Ionen mit  $\text{Na}_2\text{S}$  ge-

waschen und über Nacht in durchlüftetem, fließendem Leitungswasser belassen. Hierauf kamen die Samen in einen Keimtrichter (s. WITTMACK<sup>3</sup>, bis zum Sichtbarwerden der Coleorhiza-Spitzen, ca. 24 Std.) und darauf weitere 24 Std. in mit feuchtem Filtrerpapier ausgelegte Petrischalen. Hatten die Wurzeln so eine Länge von 1—1,5 cm erreicht, gelangten sie in eine Durchlüftungskultur (bei  $26^\circ$  im Wasserthermostat), die im großen und ganzen nach Angaben von MACHLIS<sup>4</sup> durchgeführt wurde: 14—16 Keimlinge wurden auf eine Plexiglasplatte gebracht, die in einem zylindrischen Kulturgefäß aus Glas (Durchmesser 50 mm, Höhe 185 mm) auf kleinen Glasvorsprüngen 10 mm unterhalb des Kulturgefäßrandes ruht. Die Wurzeln der Keimlinge wachsen durch zwei etwa halbrunde Schlitze in der Platte in die im Kulturgefäß befindliche Nährlösung. Diese wird mittels eintemperierter Preßluft durchlüftet, die durch ein dem Boden des Gefäßes eingeschmolzenes Kapillarrohr, welchem ein rundgeschliffener Aquarienstein aufsitzt, zugeführt wird. Um das Wurzelhaarwachstum weitgehend zu verhindern, da sonst bei der nachfolgenden Behandlung der Wurzeln eine unvermeidliche, unterschiedliche Verletzung der Haare zu unterschiedlicher Atmung und damit zu einem ungleichartigen physiologischen Zustand der miteinander zu vergleichenden Objekte führen würde, wurde die bei MACHLIS<sup>4</sup> benutzte Nährösung von ULRICH<sup>5</sup>, die bei unserem Objekt noch reichliche Haarbildung zuließ, wie folgt abgeändert: Ausgehend von der Tatsache, daß  $\text{K}^+$  — im Antagonismus mit  $\text{Ca}^{++}$  — die Wurzelhaarbildung unterdrückt (s. hierzu z. B. KISSER<sup>6</sup>), wurden die Gerstenkeimlinge in Nährösungen mit verschiedenen K- und Ca-Konzentrationen gezogen (Ca-freie Nährösungen wirkten stark hemmend auf das Wurzelwachstum). Dabei ergab die folgende Nährösung eine fast vollständige Unterdrückung der Haarbildung bei sonst normalem (Kontrolle!) Wurzelwachstum: ad 1000 cm<sup>3</sup>: 0,7 cm<sup>3</sup> 1,0-m.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,42 cm<sup>3</sup> 0,1-m. NaCl, 3,5 cm<sup>3</sup> 0,1-m.  $\text{NaHCO}_3$ , 3,85 cm<sup>3</sup> 0,01-m.

<sup>1</sup> W. SIMONIS u. H. KATING, Z. Naturforschg. **11 b**, 165 [1956].

<sup>2</sup> L. J. AUDUS u. A. GARRARD, J. exp. Bot. **4**, 330 [1953].

<sup>3</sup> L. WITTMACK, Landwirtschaftliche Samenkunde. 2. Aufl., Berlin 1922.

<sup>4</sup> L. MACHLIS, Amer. J. Bot. **31**, 183 [1944].

<sup>5</sup> A. ULRICH, Amer. J. Bot. **28**, 526 [1941].

<sup>6</sup> J. KISSER, Planta **3**, 563 [1927].

KCl und 0,0115 g  $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ . Die Nährösung wurde P-frei gehalten, um eine für die nachfolgenden Versuche ausreichende P-Verarmung zu erreichen (die Wurzeln hatten zur Zeit des Versuches 5–6 γ P/mg Trockengewicht). Nährösung und Gefäße wurden sterilisiert. Bakterien- und Pilzbefall wurde nicht festgestellt. In der Durchlüftungskultur verblieben die Pflanzen 3 Tage, wonach die Wurzeln eine Länge von 12 bis 16 cm erreicht hatten. Für den Versuch wurden die Wurzeln am Abend vorher vom Sproß abgetrennt, die 12–15 cm langen Wurzeln aussortiert und mittels Rasierklingen auf einer Paraffinplatte in 15 mm lange Stücke geschnitten, wobei die Wurzelspitze sowie die daran anschließende Zellstreckungs-Zone verworfen wurde. Alle diese Manipulationen wurden mit Pinseln durchgeführt. Die Wurzeln waren dabei ständig mit Wasser bedeckt. Nach nochmaligem Waschen der Wurzelstückchen mit dest. Wasser kamen sie über Nacht in eine verdunkelte Durchlüftungskultur mit der oben angegebenen Nährösung.

2. Anzucht der Hefe: Ein 500-cm<sup>3</sup>-Standkolben wurde zur Hälfte mit folgender Nährösung (nach FÜCHTBAUER<sup>7</sup>) beschickt: 0,5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,07%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1%  $\text{MgSO}_4$ , 0,1% NaCl, 2% Saccharose, 0,25% Pepton (Witte), 5 Vol-% Bierwürze, pH 5,8. Aus der Mitte eines kompakten Stückes Bäckerhefe wurde mittels eines sterilen Skalpells ein ca. 1,5 mm<sup>3</sup> großes Stück herausgeschnitten und in den zuvor zusammen mit der Nährösung sterilisierten Kolben gebracht, in welchen außerdem noch 5 Tropfen steriler Ölsäure zur Verhinderung des Schämens bei der nachfolgenden Durchlüftung zugegeben war. Die Durchlüftung geschah mit entkeimter und gereinigter Luft. Nach 2 Tagen bei 26°C wurde die Hefe zwecks P-Verarmung abzentrifugiert, 2-mal mit P-freier Nährösung (s. u.) gewaschen und dann 2 weitere Tage – wiederum bei 26°C und Durchlüftung – in die folgende P-freie Nährösung gebracht: 0,5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,255%  $\text{KNO}_3$  (an Stelle des prim. und sekund. K-Phosphats), 0,1%  $\text{MgSO}_4$ , 0,1% NaCl, 2% Saccharose.

#### Anordnung der Versuche

1. Wurzelversuche: Zur  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung wurden die von GRUBE<sup>8</sup> beschriebenen Einsätze in 50-cm<sup>3</sup>-Bechergläser – jedoch mit Löchern von höchstens 1 mm Durchmesser – benutzt. Die Wurzelstückchen wurden direkt vor dem Versuch bei Grünlicht dem Durchlüftungsgefäß entnommen und in einer Menge von je 600 bzw. 650 mg Frischgewicht in die Einsätze gebracht, die sich in mit 10 cm<sup>3</sup> der oben angegebenen Nährösung beschickten 50-cm<sup>3</sup>-Bechergläsern befanden. Die bei Versuchsbeginn zugefügte Lösung von trügerfreier  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  (je 5 cm<sup>3</sup>) war so bemessen, daß eine Endaktivität im Versuchsansatz von ca.  $150 \cdot 10^3$  Imp./Min./10 cm<sup>3</sup> erreicht wurde. Der pH-Wert betrug 6,0. Die Einlagerung dauerte bei allen Wurzelversuchen 20 Min., da wegen des Unvermögens der Stoffableitung die P-Aufnahme in die Wurzelstückchen relativ niedrig ist. (Die P-Auf-

nahme in intakte Wurzeln bei verdunkeltem Sproß erreichte die 2- bis 3-fache Höhe. Weil aber die Wurzelstückchen gleichmäßigere Werte ergaben, wurde diesen der Vorzug gegeben.) Die Beleuchtung der Versuchsgefäße geschah, wie bei GRUBE, von unten. Die Lichtintensität betrug in Höhe der Wurzeln 3200 Lux. Am Ende der 20-Min.-Einlagerung wurden die Einsätze auf eine Glasfritte gebracht, die  $^{32}\text{P}$ -haltige Lösung abgesaugt und die Wurzeln 5-mal mit je 15 cm<sup>3</sup> dest. Wasser gewaschen (Dauer 1,0 Min.), worauf die Einsätze in ein in Eis befindliches 50-cm<sup>3</sup>-Becherglas mit 7 cm<sup>3</sup> 10-proz. Trichloressigsäure (TES) getaucht wurden. Weiter wurde wie bei GRUBE verfahren, nur mit dem Unterschied, daß die gesammelten Extrakte immer gleich neutralisiert wurden, um ein Aufspalten labiler P-Ester durch saure Hydrolyse möglichst zu verhindern. Das Trockengewicht (als Bezugsgröße der ermittelten Werte in den verschiedenen P-Fraktionen) wurde nach Trocknung der mittels eines Nylonfadens gebündelten und aufgehängten Wurzelstückchen bei 105°C auf einer hochempfindlichen Torsionswaage ermittelt.

Für die Versuche über den Einfluß von Saccharose auf den P-Haushalt wurden die Wurzeln zunächst wie oben beschrieben angezogen. 10 Std. vor Versuchsbeginn kamen sie, nachdem sie in der üblichen Weise in 15-mm-Stücke zerschnitten worden waren, in eine Nährösung, die außer der angegebenen Zusammensetzung noch 1% Saccharose enthielt. Während der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung selbst befanden sich die Wurzelstückchen dann wieder in einer saccharose-freien Nährösung.

2. Hefevereuche: Bei der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung und -Extraktion konnte auf Grund diesbezüglicher Vorversuche im wesentlichen wie bei SIMONIS und KATING<sup>1</sup> beschrieben verfahren werden. Das Trockengewicht der Hefemenge im Versuchsansatz schwankte in den verschiedenen Versuchen zwischen 25 und 35 mg/20 cm<sup>3</sup>; es wurde ermittelt an einem aliquoten Teil der benutzten Hefesuspension nach Abnutzen der Nährösung im Steff-Filtrationsgerät (Membranfiltergesellschaft, Göttingen) auf einem vorgewogenen Filter (Schleicher & Schüll, Blauband Nr. 589<sup>3</sup>); die  $^{32}\text{P}$ -Aktivität war von gleicher Höhe wie bei den Wurzelversuchen; die Ansatzlösung hatte einen pH-Wert von 3,0; die Einlagerungsdauer betrug 15 Minuten. Bis zum Versuchsbeginn befand sich die Hefe im Dunkeln.

Bei den Versuchen mit Saccharose befand sich diese auch in der zur Einlagerung benutzten Nährösung, bei denjenigen ohne Saccharose wurde 35 Std. vor Versuchsbeginn die bereits seit 12 Std. P-frei gehaltene Hefe nochmals abzentrifugiert, 2-mal gewaschen, in einer saccharose- und P-freien Nährösung suspendiert und weiter durchlüftet.

### Die Versuche

#### 1. Wurzeln

a) Die Ergebnisse der Einlagerungen von  $^{32}\text{P}$  bei Wurzelstückchen von *Hordeum vulgare* (Mittel-

<sup>7</sup> W. FÜRCHTBAAUER, Arch. Mikrobiol., **26**, 209 [1957].

<sup>8</sup> K. H. GRUBE, Planta **42**, 279 [1953].

werte aus 15 vergleichbaren Versuchsansätzen) zeigt die Abb. 1 (links). Hier wurde die relative Aktivität in den verschiedenen Fraktionen auf die bei Dunkelheit in jeder der angegebenen Fraktionen erzielte Einlagerung umgerechnet. Man erkennt, daß die Einlagerung von  $^{32}\text{P}$  während des 20 Min. dauernden Versuchs bei *Belichtung* gegenüber Dunkelheit deutlich erhöht ist. Die Aktivität im Orthophosphat ist etwas weniger angestiegen als im „ges.-org.“ Phosphat, aber im ganzen ist im Licht überall mehr  $^{32}\text{P}$  eingelagert worden. Eine gesonderte Darstellung der Einlagerung in die labilen Phosphatverbindungen mußte unterbleiben, weil eine exakte Abtrennung des „7-Min.-Phosphats“ bei den Wurzelstückchen nicht gelang. Die gesamte, relativ geringere Einlagerung in das Orthophosphat gegenüber der höheren in das „ges.-org.“ Phosphat ließ sich statistisch gut sichern ( $P = 0,00035$ , vgl. PÄTAU<sup>9</sup>).

Setzt man die Gesamteinlagerung bei Belichtung und ebenfalls diejenige bei Dunkelheit gleich 100 und bezieht die Einlagerung von  $^{32}\text{P}$  in die einzelnen Fraktionen auf die jeweilige Gesamteinlagerung, so erhält man die Werte der Abb. 2 (links). In bezug auf die Gesamteinlagerung unterscheidet sich also der Anteil der einzelnen Fraktionen bei Belichtung und Dunkelheit nicht erheblich; auf die statistisch gesicherte, schwache Erhöhung des „ges.-org.“ Phosphats gegenüber der Einlagerung in das Orthophosphat im Licht sei wiederum hingewiesen.

b) Es sollte weiter geprüft werden, wieweit es möglich ist, durch Zugabe eines *Acceptors* die Phosphateinlagerung in Wurzelstückchen zu steigern. Da schon DORMER und STREET<sup>10</sup> fanden, daß steril wachsende Wurzelkulturen nach Zugabe von Rohrzucker schneller wuchsen als bei Glucosegaben, die das Wachstum nur sehr wenig förderten, und da bei den

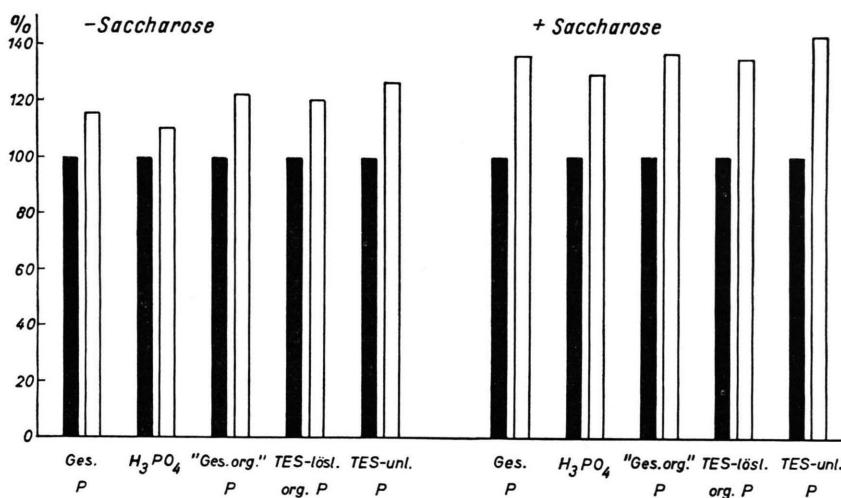


Abb. 1. *Hordeum vulgare*. Vergleich der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung in Licht und Dunkelheit (Lichtwerte bezogen auf Dunkelwerte). Inkubationszeit 20 Minuten. Aufgeführte Fraktionen: Gesamt-Phosphat (Ges.-P),  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , TES-lösliches organisches Phosphat (TES-lösl. org. P), TES-unlösliches Phosphat (TES-unl. P), „Gesamt-organisches“ Phosphat („Ges.-org.“ P) = TES-lösl. org. P + TES-unlösl. P (da hier auch die in der TES-unl. P-Fraktion wahrscheinlich enthaltenen anorganischen Polyphosphate mitgezählt werden, wird die Bezeichnung „organisch“ mit Einschränkung benutzt!). Ausgefüllte Kolonnen: Dunkelheit; nicht ausgefüllte Kolonnen: Licht. Links: ohne, rechts: mit Saccharosezugabe. Mittelwerte aus je 15 Versuchen.

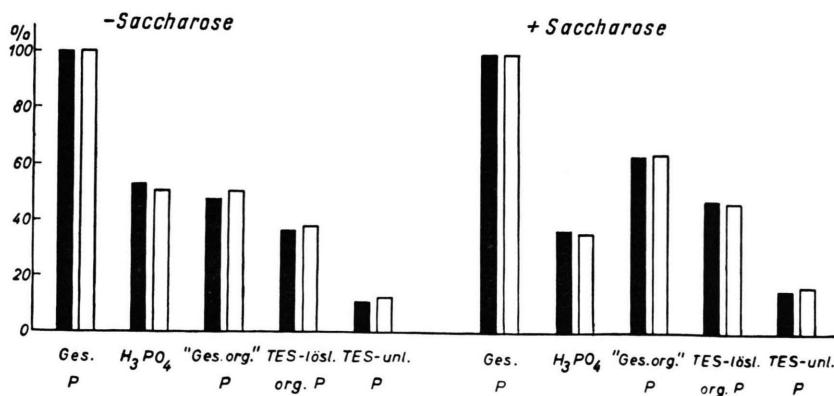


Abb. 2. *Hordeum vulgare*. Prozentuale Verteilung des aufgenommenen  $^{32}\text{P}$  auf die einzelnen Fraktionen, bezogen auf Gesamt-Phosphat. (Im übrigen s. Abb. 1.)

<sup>9</sup> K. PÄTAU, Biol. Zbl. **63**, 152 [1943].

<sup>10</sup> K. J. DORMER u. H. E. STREET, Ann. Bot. N.S. **13**, 199 [1949].

unten beschriebenen Hefeversuchen für deren Aufzucht Rohrzucker verwendet wurde, wurde dieser hier ebenfalls als Acceptor geboten. Damit mußten wir allerdings in Kauf nehmen, daß die hier dargestellten Ergebnisse mit unseren Versuchen an Grünalgen (SIMONIS und KATING<sup>1</sup>), wo Glucose als Acceptor für eine vermehrte Einlagerung von  $^{32}\text{P}$  im Licht geboten wurde, nicht unmittelbar vergleichbar sind; denn sowohl der Aufnahmemechanismus als auch der Energiebedarf für die Aufnahme von Glucose und Rohrzucker dürfte unterschiedlich sein (vgl. ROTHSTEIN<sup>11</sup>). Wurde den Wurzelstückchen vor der Einlagerung für 10 Stdn. eine 1% Rohrzucker enthaltende Nährlösung geboten, so erhielten wir die in Abb. 1 rechts dargestellten Werte der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung. Der Vergleich der prozentualen relativen Aktivität in den jeweiligen Fraktionen ergibt unmittelbar, daß durch die vorherige Rohrzuckergabe eine deutliche Steigerung der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung im Licht gegenüber den Lichtwerten ohne Saccharose-Vorbehandlung eingetreten ist. Die lichtabhängige Phosphorylierung unterscheidet sich aber im übrigen unter den hier gewählten Versuchsbedingungen bei Saccharose-Vorfütterung *nicht* von den Kontrollen. Auch hier ist die Förderung der Einlagerung in die Orthophosphat-Fraktion etwas niedriger als die in das „ges.-org.“ Phosphat. Die prozentuale Verteilung des  $^{32}\text{P}$  auf die untersuchten Fraktionen

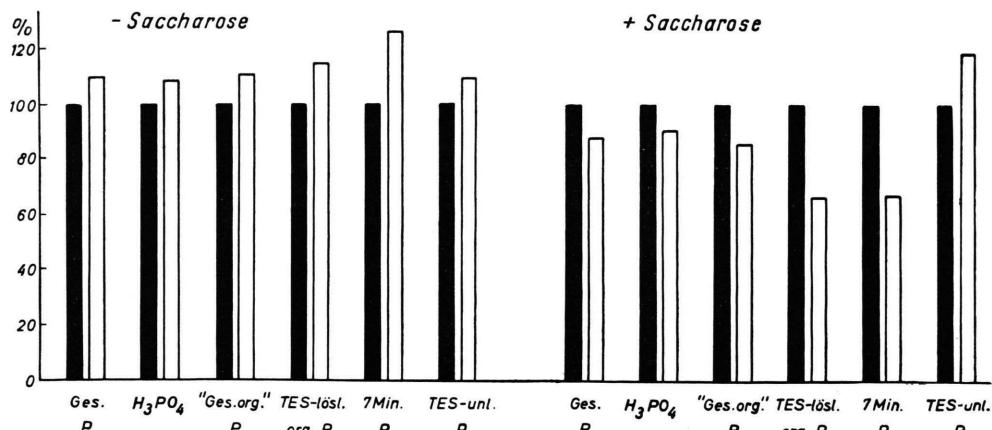


Abb. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. Vergleich der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung in Licht und Dunkelheit (Lichtwerte bezogen auf Dunkelwerte). Inkubationszeit 15 Minuten. (Im übrigen s. Abb. 1.) Mittelwerte bei -Saccharose aus 15, bei +Saccharose aus 11 Einzelwerten berechnet.

zeigt Abb. 2 rechts. Wiederum ist hier der prozentuale Anteil der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung bei Belichtung und Dunkelheit fast vollständig gleich geblieben.

<sup>11</sup> A. ROTHSTEIN, Protoplasmatologia II, E 4 [1954].

Bei dem Vergleich der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung bei Saccharosegaben gegenüber den Kontrollen (Abb. 2 links und rechts) zeigt sich aber, daß ein deutlicher Einfluß der Saccharose-Vorbehandlung auf den Phosphatstoffwechsel sowohl im Licht als auch im Dunkeln vorhanden ist: Die Einlagerung in den TES-lösli. org. Phosphatanteil ist wesentlich gestiegen und damit auch der Anteil im „ges.-org.“ Phosphat; der  $^{32}\text{P}$ -Anteil des Orthophosphats ist dagegen entsprechend erniedrigt. Die Aktivität des TES-unlösli. Phosphats schließlich ist bei Rohrzuckergaben gegenüber den Kontrollen prozentual nur wenig verändert.

## 2. Hefe

a) Im Vergleich zu den Versuchen mit Wurzelstückchen schien uns die Untersuchung eines weiteren nicht chlorophyllhaltigen Organismus sehr wünschenswert. So wurde die Einlagerung von  $^{32}\text{P}$  bei der Hefe zunächst in saccharosefreier Nährlösung geprüft. Dabei zeigte sich, daß eine 15 Min. dauernde Einlagerung von  $^{32}\text{P}$  in Hefe durch Belichtung gegenüber Dunkelheit ebenfalls gefördert wird (Abb. 3, links). Hier ist die Erhöhung des  $^{32}\text{P}$ -Gehalts in der leicht hydrolysierbaren Phosphatfraktion (7-Min.-Phosphat) auffällig. Sonst ist durch die Belichtung nur eine deutliche, wenngleich nicht sehr erhebliche, allgemeine Steigerung der Phosphateinlagerung eingetreten.

## + Saccharose

Die prozentuale Verteilung der Einlagerung weist bei Belichtung wiederum fast *keine* Unterschiede (nur 7-Min.-P;) gegenüber Dunkelheit auf (Abb. 4, links). Die Ergebnisse entsprechen also in dieser Hinsicht annähernd den bei Wurzeln gefundenen

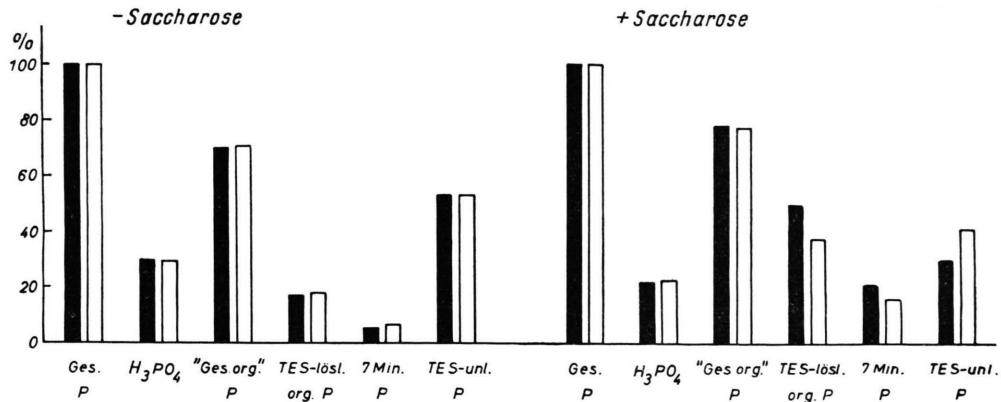


Abb. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. Prozentuale Verteilung des aufgenommenen  $^{32}\text{P}$  auf die einzelnen Fraktionen, bezogen auf Gesamt-Phosphat. (Im übrigen s. Abb. 1.)

Verhältnissen. Allerdings ist der prozentuale Anteil der Einlagerung in die einzelnen Fraktionen bei der Hefe unter den gewählten Versuchsbedingungen wesentlich anders als bei den Wurzeln (vgl. Abb. 2 links mit 4 links). Es tritt zunächst die geringe Einlagerung in das Orthophosphat hervor. Vor allem aber ergibt sich eine auffällig geringe Einlagerung in das TES-lös. org. Phosphat. Der Anteil des in TES-unlöslichem Phosphat eingelagerten  $^{32}\text{P}$  ist dagegen im Vergleich zu den Wurzeln sehr hoch (53% gegenüber 16%). Ohne Rohrzuckerzugabe wird demnach bei der Hefe ein relativ großer Anteil des aufgenommenen  $^{32}\text{P}$  im TES-unlöslichen Phosphat wiedergefunden.

b) Auch bei diesem Objekt wurde nun noch die Wirkung von gleichzeitig mit der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung gebotener Saccharose auf die Phosphateinlagerung bei Licht und Dunkelheit untersucht. Die Ergebnisse der 15 Min. dauernden Einlagerung sind sehr auffällig (Abb. 3 rechts): Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen wird nur die Einlagerung von  $^{32}\text{P}$  in das TES-unlösliche Phosphat durch Belichtung in Gegenwart von Saccharose deutlich gefördert. Die Einlagerung in das TES-lös. org. Phosphat und entsprechend in das 7-Min.-Phosphat erscheint dagegen erheblich verringert. Der Anteil des Orthophosphats wird am wenigsten betroffen; er ist schwach erniedrigt. Insgesamt ist die  $^{32}\text{P}$ -Aufnahme im Licht gegenüber Dunkelheit sogar etwas herabgesetzt.

Die prozentuale Verteilung ist hier bei Belichtung und Dunkelheit deutlich verschieden (Abb. 4 rechts): Im Licht ist gegenüber Dunkelheit eine deutliche prozentuale Erhöhung des  $^{32}\text{P}$  im TES-unlöslichen Phos-

phat, dagegen eine Erniedrigung im TES-lös. org. Phosphat bzw. im 7-Min.-Phosphat eingetreten.

Der Vergleich der Einlagerung bei Saccharose-Gegenwart gegenüber der bei fehlender Saccharose zeigt bei diesen verschiedenen Versuchsbedingungen also einen erheblichen Unterschied im Phosphatstoffwechsel (Abb. 4). Ohne Saccharose wird ein viel größerer Anteil an  $^{32}\text{P}$  in das TES-unlösliche Phosphat eingelagert, als in seiner Gegenwart. Im Dunkeln scheint dieser Anteil noch weiter vermindert zu sein. Dagegen ist in Gegenwart von Rohrzucker wesentlich mehr  $^{32}\text{P}$  im TES-lös. org. Phosphat wiederzufinden; ein Befund, der sich bereits bei den Wurzeln nach vorheriger Rohrzuckergabe bemerkbar machte.

### Besprechung der Ergebnisse

1. Die hier mitgeteilten Versuche ergaben also bei Wurzelstückchen von *Hordeum* bei Belichtung gegenüber Dunkelheit eine deutliche *Erhöhung* der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung, die durch vorherige Saccharosegaben noch verstärkt wurde. Eine Änderung der prozentualen Verteilung der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung in die einzelnen Phosphatfraktionen trat bei Belichtung nur in bezug auf das TES-lös. org. und damit auf das „ges.-org.“ Phosphat gegenüber Orthophosphat auf. Saccharose änderte sowohl im Licht als auch bei Dunkelheit die  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung zugunsten des TES-lös. org. Phosphats. In ähnlicher Weise konnte auch bei Hefe durch Belichtung eine erhebliche Änderung der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung festgestellt werden. Ohne Saccharose wurde in allen Phosphatfraktionen eine Steigerung beobachtet, bei Gegenwart von Saccharose

war jedoch eine deutliche Steigerung nur im TES-unlöslichen Phosphat gegenüber einem merklichen Abfall der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung in das TES-lösliche org. Phosphat aufgetreten. Die prozentuale Verteilung der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung blieb ohne Saccharosegaben bei Licht und Dunkelheit annähernd gleich, in Gegenwart von Saccharose war sie jedoch wegen der im Licht andersartigen Beeinflussung der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung in die einzelnen Fraktionen verschieden.

Diese an Wurzelgewebe einerseits und Hefezellen andererseits gewonnenen Ergebnisse lassen allerdings noch keinen Rückschluß auf Gleichartigkeit oder Verschiedenheit des Lichteinflusses auf den P-Stoffwechsel der beiden benutzten Objekte zu. So kann z. B. das unterschiedliche Verhalten bei Saccharosegabe möglicherweise in der aus technischen Gründen zunächst noch unterschiedlichen Versuchsanordnung begründet sein: bei den *Hordeum*-Wurzeln wurde die Saccharose nur bis zum Versuchsbeginn, bei Hefe auch während des Versuchs geboten. Durch unsere früheren Versuche ist aber bekannt, daß hierdurch erhebliche Unterschiede in der  $^{32}\text{P}$ -Verteilung auf die untersuchten Fraktionen auftreten können (SIMONIS und KATING<sup>1</sup>). Weiterhin ist, wie neuere Versuche (unveröffentlicht) zeigen, offenbar auch bei dem vorliegenden Material ebenso wie bei Algen die Vorbehandlung von großer Bedeutung. Geringfügig erscheinende Änderungen der Anzuchtbedingungen, der Dauer der Saccharosefütterung, der Phosphatverarmung etc. sind keinesfalls außer Acht zu lassen und dürften sich bei Hefe und Wurzeln möglicherweise völlig verschieden auswirken.

Schließlich möchten wir besonders darauf hinweisen, daß hier zunächst lediglich eine bestimmte Einlagerungszeit jeweils für Hefe und Wurzeln gewählt wurde. Die in Gang befindliche Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Einlagerung wird die bisherigen Einzelergebnisse unter Berücksichtigung der turnover-Vorgänge noch erweitern.

Gemeinsam ist aber zweifellos beiden Objekten eine deutliche Abhängigkeit der  $^{32}\text{P}$ -Einlagerung

vom Licht, so daß also auch bei chlorophyllfreien Zellen eine Lichtabhängigkeit des Phosphathaushalts vorhanden ist. Außerdem ergibt sich im Vergleich zu chlorophyllhaltigen Zellen auch hier die Möglichkeit, den Phosphathaushalt durch Zugabe einer möglicherweise als P-Acceptor wirkenden Substanz, in diesem Fall Saccharose, zu beeinflussen. Dies Saccharoseangebot scheint zu einer Vermehrung von TES-löslichen phosphorylierten organischen Verbindungen zu führen, und dabei wird Orthophosphat verbraucht. Eine wesentliche Weiterverarbeitung der löslichen phosphorylierten Verbindung zu TES-unlöslichen Substanzen scheint dabei nicht zu erfolgen. Die bei Hefe beobachtete Umkehr der Verhältnisse von Licht- und Dunkleinelagerung in allen Fraktionen außer der TES-unlöslichen, welche im Licht erheblich gefördert wird, ist aus den bisherigen Ergebnissen nicht zu deuten und bedarf weiterer Untersuchungen.

2. Eine Beeinflussung stoffwechselphysiologischer Vorgänge durch Belichtung ist bei chlorophyllfreien Pflanzengeweben schon verschiedentlich festgestellt worden (vgl. z. B. Zusammenfassung SIMONIS<sup>12</sup>). Hier sei besonders darauf hingewiesen, daß bereits früher z. B. durch GUERRINI<sup>13</sup> bei der Untersuchung von Hefe beobachtet wurde, daß sowohl die Gärung als auch die Atmung durch Blaulicht gehemmt wurde, während rotes Licht die Atmung förderte. Bei dem Keimungsbeginn von *Lactuca*-Samen stellten sowohl HAGEN, BORTHWICK und HENDRICKS<sup>14</sup> als auch EVENARI, NEUMANN und KLEIN<sup>15</sup> eine Atmungszunahme bei rotem Licht fest. Bei Belichtung ist sowohl mit der Aktivierung oder Inaktivierung von Enzymsystemen (TOLBERT und BURRIS<sup>16</sup>; PIRINGER und HEINZE<sup>17</sup>) als auch mit Änderungen der Viskosität (STÅLFELDT<sup>18</sup>, VIRGIN<sup>19</sup>) und der „Permeabilität“ (BRAUNER<sup>20</sup>, JÄRVENKYLÄ<sup>21</sup>, LEPESCHKIN<sup>22</sup>) zu rechnen. Vor allem muß die durch Licht beeinflußbare Ionenaufnahme bei Wurzeln (VAN ANDEL und Mitarbb.<sup>23</sup>) genannt werden. Auch die von ARISZ<sup>24</sup> allerdings bei *Vallisneria*-Blättern gefundene licht-

<sup>12</sup> W. SIMONIS, Handb. d. Pflanzenphysiologie II, 655 [1956].

<sup>13</sup> G. GUERRINI, Mem. R. Accad. Sci. Ist. Bologna IX, 7, 179 [1940].

<sup>14</sup> C. E. HAGEN, H. A. BORTHWICK u. S. B. HENDRICKS, Bot. Gaz. 115, 360 [1954].

<sup>15</sup> M. EVENARI, G. NEUMANN u. SH. KLEIN, Physiol. Plantarum [Copenh.] 8, 33 [1955].

<sup>16</sup> N. E. TOLBERT u. R. H. BURRIS, J. biol. Chemistry 186, 791 [1950].

<sup>17</sup> A. A. PIRINGER u. P. H. HEINZE, Plant Physiol. 29, 467 [1954].

<sup>18</sup> M. L. STÅLFELDT, Ark. Bot. 33 A, 1 [1947].

<sup>19</sup> H. J. VIRGIN, Physiol. Plantarum [Copenh.] 7, 343 [1954].

<sup>20</sup> L. BRAUNER, Handbuch der Pflanzenphysiologie II, 381 [1956].

<sup>21</sup> Y. T. JÄRVENKYLÄ, Ann. bot. Soc. Zool. bot. fenn., Vanamo Tom. 9, 1 [1937].

<sup>22</sup> W. W. LEPESCHKIN, Protoplasma 34, 55 [1940].

<sup>23</sup> O. M. VAN ANDEL, W. H. ARISZ u. R. J. HELDER, Proc. Sect. Sci. Kon. nederl. Akad. Wetensch. 53, 159 [1950].

<sup>24</sup> W. H. ARISZ, Nature [London] 174, 223 [1954].

abhängige Anionenbewegung (Chlorid) zwischen Vakuole und Cytoplasma ist in diesem Zusammenhang erwähnungswert.

Da das Wirkungsspektrum der Beeinflussung stoffwechselphysiologischer Vorgänge durch Belichtung erst wenig untersucht wurde und auch bei unseren Untersuchungen einstweilen nicht bekannt ist, können über die bei chlorophyllfreiem Gewebe in Frage kommenden Acceptoren der Lichtenergie nur Vermutungen in Anschluß an wachstumsphysiologische Befunde geäußert werden. Nach solchen Untersuchungen könnten verschiedene, besonders am Aufbau von Enzymen beteiligte Pigmente für eine Lichtabsorption in chlorophyllfreiem Gewebe in Frage kommen: Ein Porphyrinsystem, ein Cytochromsystem, Riboflavin (TODD und GALSTON<sup>25</sup>, PIRINGER und HEINZE<sup>17</sup>, EVENARI und STEIN<sup>26</sup>, STOY<sup>27</sup>, DUYSENS<sup>28</sup>; vgl. LANG<sup>29</sup> sowie SIMONIS<sup>12</sup>). Daß ein Zusammenhang zwischen Riboflavin und P-Aufnahme besteht, ist schon länger bekannt, da Riboflavin die <sup>32</sup>P-Aufnahme bei Hefen, die Glucose und Rohrzucker verarbeiten, fördert (NICKERSON und MULLINS<sup>30</sup>).

Diese Hinweise mögen genügen, um darzutun, daß eine Beeinflussung des Phosphatstoffwechsels bei Belichtung in chlorophyllfreiem Gewebe nach Absorption des wirksamen Lichtes in einem geeigneten Pigmentsystem und anschließender, vielleicht nur wenig Energie erfordernder lichtabhängiger Enzymaktivierung oder Inaktivierung ohne weiteres als möglich anzusehen ist.

Da unsere bisherigen Versuchsergebnisse noch keinen Schluß über die Orte der lichtbedingten Beeinflussung des Phosphatstoffwechsels gestatten, sei hier nur darauf hingewiesen, daß eine solche Beeinflussung zunächst sowohl während der Phosphataufnahme (vgl. VAN ANDEL und Mitarbb.<sup>23</sup>; HELDER<sup>31</sup>; LEPESCHKIN<sup>22</sup>) als auch im Verlauf des intermediären Stoffwechsels als möglich erscheint. In unseren Versuchen könnte die Änderung der Gesamteinlagerung von <sup>32</sup>P mit Veränderungen der Phosphataufnahme, diejenige der Verteilung des <sup>32</sup>P in die untersuchten Phosphatkationen mit lichtbedingten Verschiebungen des intermediären Phosphatstoffwechsels in Zusammenhang gebracht werden. Für eine genauere Klärung ist aber eine weitergehende Untersuchung der turnover-Vorgänge erforderlich.

3. In früheren Mitteilungen konnten wir nachweisen<sup>1, 32</sup>, daß bei *Helodea*-Blättern und ebenso bei

Grünalgen (*Ankistrodesmus*) eine lichtabhängige Phosphorylierung abläuft, die wir vorwiegend mit der Photosynthese und ihren Folgeprozessen in Zusammenhang brachten. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse ist es nun nicht ausgeschlossen, daß auch bei chlorophyllhaltigen pflanzlichen Zellen eine ähnliche lichtabhängige Phosphorylierung vor sich geht, wie wir sie hier bei chlorophyllfreien Zellen festgestellt haben, die jedoch nichts mit der Photosynthese und ihren Folgeprodukten zu tun hat. Dies könnte besonders dann der Fall sein, wenn die CO<sub>2</sub>-Assimilation bei CO<sub>2</sub>-Ausschluß stark verringert ist. Auch unter solchen Bedingungen fanden wir<sup>1, 32</sup> noch eine deutliche Erhöhung der <sup>32</sup>P-Einlagerung in organische Phosphatverbindungen im Licht.

Wir müssen nunmehr also neben der Photosynthese-Phosphorylierung (1), — Phosphorylierungs-Prozesse, die mit den Primärvorgängen der Photosynthese in Zusammenhang stehen — und den im Verlauf der Folgeprozesse der Photosynthese (2) wahrscheinlich auftretenden Änderungen des Phosphatstoffwechsels auch noch mit einem dritten lichtabhängigen Phosphorylierungs-Prozeß rechnen, den wir zunächst als „photosensibilisierte Phosphorylierung“ (3) bezeichnen. Schließlich könnte die Phosphataufnahme als solche lichtabhängig sein (4). Diese bei Belichtung chlorophyllhaltiger Gewebe möglichen und bei ihrem Vorhandensein außerdem sicher ineinander greifenden Prozesse gilt es, in Zukunft zu unterscheiden. Der Anteil und die Bedeutung der hier festgestellten photosensibilisierten Phosphorylierung und der möglicherweise lichtabhängigen Phosphataufnahme selbst an der von uns früher<sup>1</sup> mitgeteilten lichtabhängigen Phosphorylierung bei *Helodea* und *Ankistrodesmus* ist einstweilen nicht leicht abzuschätzen. Es ist zunächst unbekannt, ob die Ergebnisse bei chlorophyllfreiem Gewebe ohne weiteres auf chlorophyllhaltige Gewebe übertragen werden können. Aber auch wenn diese Voraussetzung zutrifft, wissen wir einstweilen nicht, wie weit sich die Vorgänge der Photosynthese-Phosphorylierung mit denjenigen der photosensibilisierten Phosphorylierung überlagern. Auch ist das Ausmaß der photosensibilisierten Phosphorylierung und die Frage des veränderten Energieverbrauchs noch

<sup>25</sup> G. W. TODD u. A. W. GALSTON, Plant Physiol. **29**, 311 [1954].

<sup>26</sup> M. EVENARI u. G. STEIN, Experientia [Basel] **9**, 94 [1953].

<sup>27</sup> V. STOY, Physiol. Plantarum **8**, 963 [1955].

<sup>28</sup> L. N. M. DUYSENS, Nature [London] **173**, 692 [1954].

<sup>29</sup> A. LANG, Fortschr. Bot. **17**, 712 [1956].

<sup>30</sup> W. J. NICKERSON u. L. J. MULLINS, Nature [London] **161**, 939 [1948].

<sup>31</sup> R. J. HELDER, Acta bot. neerl. **1**, 361 [1952].

<sup>32</sup> W. SIMONIS u. K. H. GRUBE, Z. Naturforschg. **7b**, 194 [1953].

zu wenig bekannt. Auf jeden Fall wird sorgfältig zu prüfen sein, auf welche der hier besprochenen Prozesse die bisherigen Beobachtungen über eine lichtabhängige Phosphorylierung zurückzuführen sind.

Sowohl bei den von WINTERMANS<sup>33</sup> sowie früher von WASSINK, WINTERMANS und TJA<sup>34</sup> mitgeteilten Befunden lichtabhängiger Veränderungen des Phosphatstoffwechsels als auch bei den ersten Ergebnissen KANDLERS<sup>35</sup> über die Beeinflussung des Orthophosphatspiegels in *Chlorella* bei Belichtung, ist die Mitwirkung dieser photosensibilisierten Phosphorylierung oder einer lichtabhängigen Phosphataufnahme nicht ausgeschlossen. Ob an der Förderung der auf Photosynthese-Phosphorylierung zurückgeführten Glucoseaufnahme im Licht (KANDLER<sup>36</sup>, SIMONIS<sup>37</sup>) und ihrer unterschiedlichen Veränderung durch Hemmstoffe (KANDLER<sup>38</sup>) photosensibilisierte Phosphorylierungs-Prozesse beteiligt sind, erscheint zwar fraglich, ist aber einstweilen jedenfalls nicht völlig auszuschließen. Die von STREHLER<sup>39</sup> festgestellte vermehrte ATP-Bildung bei Belichtung von grünen Pflanzenzellen kann wohl nach wie vor vorwiegend der Photosynthese-Phosphorylierung zugeschrieben werden, obwohl auch hier noch Einwände möglich sind. Der Nachweis einer anaerob

verlaufenden Photosynthese-Phosphorylierung von intakten Chloroplasten bzw. Chloroplastenfragmente (ARNON und Mitarbb.<sup>40</sup>; WHATLEY und Mitarbb.<sup>41</sup>) schließlich würde völlig eindeutig sein, wenn mit Sicherheit feststünde, daß die Chloroplasten, bzw. die Fragmente, keinen besonderen Stoffwechsel (z. B. eine ohne Sauerstoffbedarf mögliche Substrat-Phosphorylierung) besitzen, der auch ohne Photosynthese abläuft und der durch Belichtung ähnlich wie bei den hier mitgeteilten Befunden verändert werden kann. Auch muß daran gedacht werden, daß es einen lichtabhängigen Phosphataufnahme-Vorgang in die Chloroplasten geben könnte.

Es zeigt sich also, daß die hier mitgeteilten Befunde einer photosensibilisierten Phosphorylierung bzw. einer lichtabhängigen Phosphataufnahme chlorophyllfreier Pflanzenzellen auch alle bisherigen Ergebnisse über die lichtabhängige Phosphorylierung bzw. die Photosynthese-Phosphorylierung chlorophyllhaltiger Zellen und der Chloroplasten selbst betreffen. Es kann jedoch erst durch weitere Versuche entschieden werden, wie weit hier in der Tat ein solcher Einfluß vorliegt.

Die Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

<sup>33</sup> J. F. G. M. WINTERMANS, Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen/Nederl. **55**, 69 [1955].

<sup>34</sup> E. C. WASSINK, I. F. G. M. WINTERMANS u. I. E. TJA, Proc. Roy. Netherl. Acad. Sci. C **54**, 496 [1951].

<sup>35</sup> O. KANDLER, Z. Naturforsch. **5 b**, 423 [1950].

<sup>36</sup> O. KANDLER, Z. Naturforsch. **9 b**, 625 [1954].

<sup>37</sup> W. SIMONIS, Z. Naturforsch. **11 b**, 354 [1956].

<sup>38</sup> O. KANDLER, Z. Naturforsch. **10 b**, 38 [1955].

<sup>39</sup> B. L. STREHLER, Arch. Biochem. Biophysics **43**, 67 [1953].

<sup>40</sup> D. I. ARNON, Science [Washington] **122**, 9 [1955]; D. I. ARNON, M. B. ALLEN, F. R. WHATLEY, J. B. CAPINDALE u. L. L. ROSENBERG, Conférences et Rapports présentés au 3ème Congrès international de Biochimie, Bruxelles. Liège 1956, S. 227.

<sup>41</sup> F. R. WHATLEY, M. B. ALLEN u. D. I. ARNON, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **16**, 605 [1955].