

Vorübergehende pH-Änderungen im umgebenden Medium intakter grüner Zellen bei Beleuchtungswechsel

Light-Triggered Transient Changes of the Medium pH of Intact Green Cells

ENNO BRINCKMANN und ULRICH LÜTTGE

Botanisches Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

(Z. Naturforsch. 27 b, 277—284 [1972]; eingegangen am 23. Juni 1971, revidiert am 11. November 1971)

When light is switched on or off the pH of the medium of green cells of a large number of various plant species investigated (*Elodea*, *Zea mays*, *Amaranthus caudatus*, *Oenothera hookeri* × *albicans*, *Mnium undulatum*, *Scenedesmus obliquus*) increases or decreases respectively. This effect is linked with the non-cyclic photosynthetic electron flow: 1. the effect is independent of the gross ion content of the external medium, 2. green plant cells deficient in photosystem II do not show the effect, 3. addition of $2 \cdot 10^{-6}$ M DCMU to the medium has a similar effect as switching off the light. The pH-effect is inhibited by FCCP, it is abolished in N_2 , but a normal effect is observed in CO_2 -free air. The transient changes of H^+ -net flux upon change of illumination are discussed in relation to both the proton pump of the thylakoid membranes of chloroplasts and to CO_2 fixation after the uptake of HCO_3^- from the external solution coupled with the release of OH^- ions. The results are also compared to other signals of similar kinetics observed in experiments with intact plant cells, especially with light-triggered transients of membrane potential and ATP-level.

In einer Fülle von Untersuchungen mit isolierten Chloroplastenfragmenten wurde beobachtet, daß der photosynthetische Elektronenfluß in den Thylakoidmembranen mit einer H^+ -Aufnahme durch die Membranen in das Innere der Thylakoide gekoppelt ist. So allgemein anerkannt dies als Tatsache ist, so umstritten ist gleichzeitig, ob sich in intakten grünen Zellen die Elektronentransport-abhängigen Veränderungen der H^+ -Gradienten an den Thylakoidmembranen über die Chloroplastenhülle bis zum Plasmalemma hin fortpflanzen¹.

Beim An- und Abschalten der Beleuchtung treten vorübergehende Oszillationen des Membranpotentials intakter grüner Zellen auf, die durch mit dem An- und Abschalten des photosynthetischen Elektronentransportes zusammenhängende H^+ -Ionenverschiebungen innerhalb der Zellen bedingt sein könnten¹⁻⁴. Einen Hinweis darauf geben Beobachtungen, daß vorübergehende Änderungen des MilieupH-Wertes mit ähnlicher Kinetik ablaufen^{5,6} und mit den Membranpotentialveränderungen korreliert werden können⁴. Andererseits kann man argumentieren, daß die pH-Änderungen im Milieu nicht unmittelbar durch die mit dem Elektronenfluß verbundenen H^+ -Fluxe zustandekommen, sondern durch die photosynthetische CO_2 -Assimilation bedingt sind, und somit nur indirekt vom Elektronenfluß

abhängen, wenn CO_2 in Form von HCO_3^- aus der Lösung in die Zellen aufgenommen wird⁷.

Die hier beschriebenen Untersuchungen der Lichtausgelösten Milieu-pH-Änderungen werden mit Bezug auf diese beiden Deutungsmöglichkeiten diskutiert und mit anderen Signalen intakter grüner Zellen von mehr oder weniger ähnlicher Kinetik verglichen, bei denen H^+ -Ionen eine Rolle spielen können.

Material und Methoden

Mnium undulatum wurde als Frischmaterial in den Wäldern um Darmstadt gesammelt, abgezapfte Blättchen und zerschnittene junge Sprosse wurden für die Versuche benutzt. *Elodea densa* wuchs in Becken im Gewächshaus. *Zea mays* (cultivar. INRA und PIONEER), *Oenothera hookeri* × *albicans*- und *Amaranthus caudatus*-Pflanzen wurden in Bodenkultur im Gewächshaus angezogen. Die Blätter wurden zu den Versuchen nach Entfernen der Mittelrippe in 0,5 mm dicke Streifen längs geschnitten. Leitbündelscheidengewebe von Maisblättern wurde nach der Methode von Woo et al.⁸ präpariert. *Scenedesmus obliquus*, Stamm GAFFRON D3, und *Scenedesmus obliquus*, Mutante BISHOP 11, wurden von der Algensammlung Göttingen bezogen.

Zur pH-Messung dienten eine Glas-Kalomel- oder eine Einstab-Silber-Elektrode (Ingold 403-30 M8). Die Einstabelektrode hat eine plane, horizontale Membran. Sie hat den Vorteil, daß die Turbulenzen der Lösung in der kräftig begasten Versuchsküvette weniger stark registriert werden. Die Meßelektroden waren über ein Radiometer pH-Meter PHM 26c (Ausgang 10 mV/

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. ULRICH LÜTTGE, Botanisches Institut der TH Darmstadt, D-6100 Darmstadt, Schnittspahnstr. 3—5.

pH-Einheit) mit einem Schreiber (Empfindlichkeits-einstellung 20 mV) gekoppelt. Als Beleuchtung diente eine Niedervoltlampe. Die Lichtintensität in der Versuchsküvette betrug ca. $120 - 170 \text{ kerg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$.

Das Pflanzenmaterial wurde am Morgen des Versuchstages präpariert und bis Versuchsbeginn in einer 10^{-4} M CaSO_4 -Lösung unter Luftzufuhr aufbewahrt. Der Chlorophyllgehalt wurde nach ARNON⁹ bestimmt. 1 g Gewebe (Frischgewicht) wurde zu den pH-Registrierungen in 30 ml Lösung (in den meisten Versuchen destilliertes Wasser) in die Versuchsküvette gebracht. Die Küvette war durch ein Wasserbad auf 25°C thermostatisiert. Der Küvetteninhalt wurde mit verschiedenen Gasen durchspült: Luft, CO_2 -freie Luft (KOH-Waschflaschen) und N_2 (Bombe).

Die bei der pH-Registrierung erhaltenen Kurven wurden vom Schreiberpapier auf semilogarithmisch eingeteiltes Papier übertragen und zum Erhalt der H^+ -Nettofluxkurven differenziert, und zwar durch Ablesen der H^+ -Konzentrationen aus der Kurve in 7,5 min auseinanderliegenden Abständen und Bilden der Differenzen. Die Flächen unter den peaks, die einer H^+ -Ionenmenge pro Gewebefrischgewicht oder Chlorophyllgehalt (Picoäquivalente H^+ /mg Chlorophyll) entsprechen, wurden durch die Wägemethode ermittelt (und zwar 5-fach nach geeigneter photographischer Vervielfältigung der Kurven). Eine eventuelle Pufferwirkung von Substanzen, die aus dem Gewebe in die Außenlösung (dest. Wasser oder 10^{-4} M CaSO_4) übergetreten sein können, wird durch diese graphische Auswertungsmethode nicht berücksichtigt.

ATP wurde mit dem Luciferin-Luciferase-Test nach PRADET¹⁰ in der früher beschriebenen Weise bestimmt¹¹.

Ergebnisse

Natur und Verbreitung des beobachteten pH-Effektes

Bei allen untersuchten Pflanzenarten, den Angiospermen *Elodea*, *Zea mays*, *Amaranthus caudatus*, *Oenothera hookeri* $\times$ *albicans*, dem Moos *Mnium undulatum* und der Chlorophyceen *Scenedesmus obliquus* sowie anderen Grünalgen, beobachteten wir nach Beleuchtungswechseln Änderungen des MilieupH-Wertes, wie sie beispielhaft in Abb. 1 dargestellt sind. Beim Übergang Licht-Dunkel werden von dem Gewebe H^+ -Ionen abgegeben oder OH^- -Ionen aufgenommen, beim Übergang Dunkel-Licht werden H^+ -Ionen aufgenommen oder OH^- -Ionen abgegeben. Die starke Durchlüftung der Küvettenlösung sollte Schwankungen des $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Gehaltes der Lösung und dadurch bedingte pH-Änderungen gering halten. Der pH-Effekt ist qualitativ und quantitativ unabhängig davon, ob sich im umgebenden Medium Ionen befinden ($0,1 \text{ mM}$ CaSO_4 ; $0,5 -$

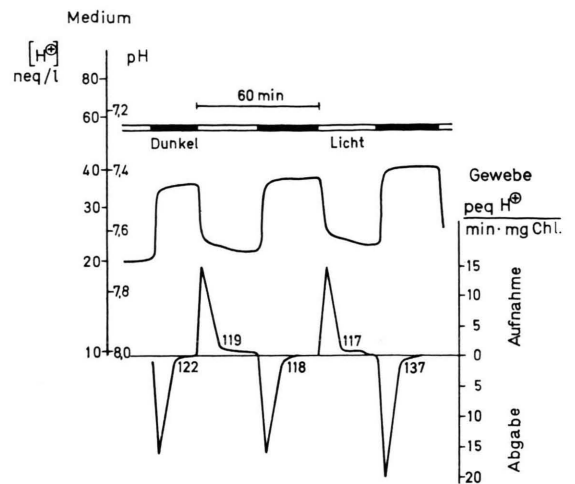


Abb. 1. Lichtabhängige pH-Änderungen im Milieu (dest. Wasser) von *Mnium undulatum*-Blättchen. Die obere Kurve gibt die pH-Änderungen im Licht-Dunkel-Wechsel an. Auf der Ordinate werden die H^+ -Konzentrationen abgelesen. Die untere Kurve zeigt die Änderung der H^+ -Konzentration pro Minute und mg Chlorophyll. Die Fläche unter den peaks entspricht dem H^+ -Nettoflux. Die Größe des H^+ -Fluxes ist an den peaks angegeben (Picoäquivalente H^+ /mg Chlorophyll).

10 mM KCl ; $0,5 - 20 \text{ mM}$ NaCl), oder ob mit destilliertem Wasser gearbeitet wird. In den Fällen, wo der Medium-pH-Wert einen Trend aufweist (konstante pH-Änderungen im Dauerlicht und im Dauerdunkel), waren die transitorischen pH-Änderungen nach einem Beleuchtungswechsel diesem Trend überlagert.

Durch die Ermittlung der Fläche unter den peaks der H^+ -Nettoflux-Kurve läßt sich ein quantitativer Ausdruck für die Größe des Effektes finden. Der Licht-an-Effekt entspricht dem Licht-aus-Effekt recht genau (Zahlenangaben in Abb. 1).

Tab. 1 zeigt, daß das Gewebe auch durch längeren Aufenthalt in der Küvette nicht geschädigt wird. Der beobachtete Effekt läßt sich unmittelbar nach dem Einbringen des Gewebes in die Küvette und nach 15 Stdn. in der durchlüfteten Küvettenlösung gleichermaßen nachweisen.

	peq H^+ /mg Chlorophyll $\pm$ Standardfehler	
	Licht an	Licht aus
bei Versuchsbeginn	$+ 737 \pm 138$	$- 456 \pm 41$
nach 15 Stdn.	$+ 999 \pm 34$	$- 738 \pm 48$

Tab. 1. pH-Änderungen des Milieus von *Zea mays*-Blattgewebe in Abhängigkeit von der Versuchsdauer (+ = H^+ -Aufnahme, - = H^+ -Abgabe).

Abhängigkeit des pH-Effektes vom pH des Milieus bei seiner Auslösung

Bei vergleichenden quantitativen Untersuchungen muß man berücksichtigen, daß die Größe des pH-Effektes wahrscheinlich vom pH bei der Auslösung eines Licht-Dunkel- oder Dunkel-Licht-Wechsels abhängt⁶. Da ein gegebener H^+ -Flux bei hohem pH (niedrige H^+ -Konzentration) eine viel größere pH-Änderung des Milieus hervorruft als bei niedrigem pH (hohe H^+ -Konzentration), haben wir versucht, nach Möglichkeit bei neutralem oder sogar leicht alkalischem pH zu arbeiten, um einen möglichst großen Schreiberausschlag zu erhalten. Der Küvetteninhalt wurde meist mit einigen Tropfen 0,1 N KOH auf pH 9–10 gebracht. Beim Durchlüften stellte sich im Laufe von 20–60 min ein bestimmter pH zwischen 6,8 und 8,0 ein, der auch vom benutzten Pflanzenmaterial abhing. Erst nach Einstellen eines konstanten pH-Wertes oder doch wenigstens nach Erreichen eines konstanten Trends konnten die Übergangsphänomene ausgelöst werden. Der pH, bei dem dies geschah, konnte aus den genannten Gründen nur in Grenzen vorher festgelegt werden. Dieser Umstand erschwert vergleichende quantitative Messungen unter verschiedenen zur weiteren Charakterisierung des Effektes gewählten Bedin-

gungen, wie z.B. der Benutzung von Inhibitoren und Gasen unterschiedlicher Zusammensetzung.

In Abb. 2 ist die Größe der gemessenen Effekte gegen den pH-Wert des Mediums bei ihrer Auslösung aufgetragen. Die Werte für *Zea mays*-Blattstreifen (Abb. 2 a) schwanken stark. Man kann aber erkennen, daß bei pH-Werten $\geq 7,6$ nur noch sehr geringe Effekte auftreten, und daß sich die größten Effekte zwischen pH 6,6 und 7,4 häufen. Bei *Mnium undulatum* ergibt sich auf den ersten Blick ein etwas klarerer Zusammenhang (Abb. 2 b). Die Abhängigkeit des Effektes vom pH-Wert bei der Auslösung ist also – wie bei BEN-AMOTZ und GINZBURG⁶ – auch bei unseren Versuchsbedingungen sehr wahrscheinlich signifikant. (Errechnet man für die beiden Kurven von Abb. 2 b, die vermutlich Äste von Optimumkurven darstellen, lineare Regressionen, erhält man ein $p < 0,05$.)

Die Wirkung von Dichlorphenyl-dimethyl-harnstoff (DCMU)

Gibt man im Licht so viel DCMU als Hemmstoff des nichtzyklischen Elektronenflusses der Photosynthese zu, daß die Endkonzentration $2 \cdot 10^{-6}$ M beträgt, erhält man einen einer Verdunkelung entsprechenden Effekt. Schaltet man anschließend noch die Beleuchtung aus, stellt sich noch ein geringer zusätzlicher Effekt ein (Abb. 3 a). Fügt man DCMU dem Küvetteninhalt sukzessive zu, beobachtet man jedes Mal einen kleinen Effekt (Abb. 3 b). In Gegenwart von $2 \cdot 10^{-6}$ M DCMU sind die Licht-an- und Licht-aus-Wirkungen nur noch gering, und zwar ca. 17–27% der Kontrollen (vgl. Zahlenangaben in Abb. 3 b). $2 \cdot 10^{-6}$ M DCMU hemmt die Photosynthese von Blattgewebestreifen bis zu weniger als 15% der Kontrollen¹¹. (Eine mögliche Pufferwirkung von DCMU konnte in Kontrollversuchen mit HCl ausgeschlossen werden.)

Die Wirkung von *p*-CF₃O-carbonyl-cyanid-phenylhydrazon (FCCP)

Bei Versuchen mit dem Entkoppler FCCP wurde das Gewebe eine Stunde mit dem Hemmstoff vorbehandelt. Schon bei geringen FCCP-Konzentrationen zeigt sich eine starke Hemmung der Protonenfluxe (Tab. 2). Hier fällt möglicherweise mit ins Gewicht, daß sich die pH-Effekte bei den Kontrollen und in Gegenwart von FCCP nicht beim

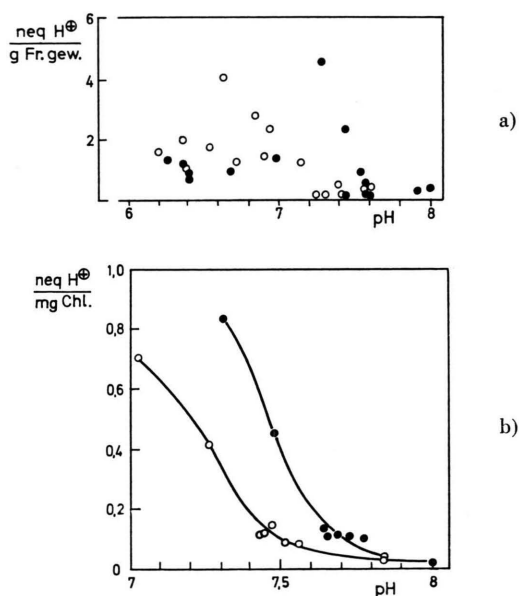


Abb. 2. Größe der H^+ -Fluxe, aufgetragen gegen den pH-Wert, bei dem das Licht eingeschaltet (○) oder ausgeschaltet (●) wurde; a) *Zea mays*-Blattgewebe, b) *Mnium undulatum*-Blättchen.

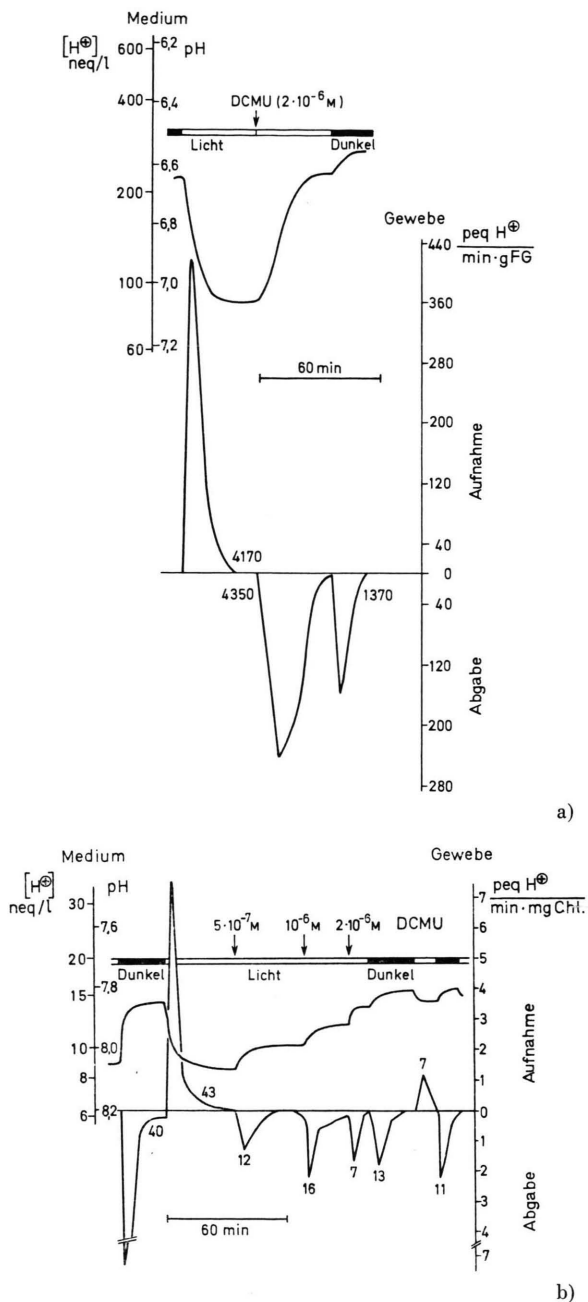


Abb. 3. DCMU-ausgelöste pH-Änderungen des Milieus a) von *Zea mays*-Blattgewebe und b) von *Mnium undulatum*. Die Zahlenangaben an den peaks (H^+ -Flux) bedeuten für *Mais* $peq H^+$ /g Frischgewicht, für *Mnium* $peq H^+$ /mg Chlorophyll.

gleichen pH-Wert auslösen ließen. Deshalb ist in Tab. 2 der pH-Wert, bei dem das Licht ein- oder ausgeschaltet wurde, mitangegeben. Vergleicht man die Größe der Effekte, die bei einem etwa gleichen

FCCP-Konzentration Mol/l	Kontrolle		mit FCCP		
	pH beim Aus- lösen	$peq H^+$ mg Chl.	pH beim Aus- lösen	$peq H^+$ mg Chl.	% der Kon- trolle
Versuch 1					
10^{-6}	6,52	527	6,74	354	68
10^{-5}	6,52	527	6,91	41	13
Versuch 2					
10^{-7}	7,58	54	7,64	17	31
Versuch 3					
$5 \cdot 10^{-8}$	7,28	50	7,78	25	50
$2 \cdot 10^{-7}$	7,28	50	7,88	19	38
$5 \cdot 10^{-7}$	7,28	50	7,83	22	44
$2 \cdot 10^{-6}$	7,28	50	7,75	22	44
$5 \cdot 10^{-6}$	7,28	50	7,76	13	25

Tab. 2. pH-Änderungen des Milieus von Mais-Blattstreifen beim Einschalten der Beleuchtung in Abhängigkeit von der FCCP-Konzentration. (Ähnliche FCCP-Wirkungen können beim Licht-aus-Effekt beobachtet werden.)

pH ausgelöst wurden, insbesondere auch bei steigender FCCP-Konzentration, so wird die Hemmung des pH-Effektes durch FCCP einwandfrei klar.

Die Wirkung verschiedener Gasgemische

Wird das Gewebe in der Küvette von CO_2 -freiem Stickstoff statt von Luft durchspült, so bleiben bei Beleuchtungswechsel die pH-Änderungen vollständig aus. Maisblattgewebe, das 6 Stdn. lang mit N_2 und anschließend mit Luft bespült wurde, zeigt den pH-Effekt nur noch in sehr geringem Maße. Die Versuche von JESCHKE¹² lassen in Gegenwart von $N_2 + 1\% CO_2$ bei Belichtung keine pH-Änderungen im Medium von *Elodea*-Blättern erkennen. Bei N_2 -Begasung allein zeigten aufeinanderfolgend ein Licht-Dunkel-, ein Dunkel-Licht- und ein Licht-Dunkel-Wechsel keine Wirkung, dann führte ein Dunkel-Licht-Wechsel zu einer beträchtlichen Ansäuerung des Milieus (JESCHKE 1970, Abb. 6)¹².

In CO_2 -freier Luft ergeben sich die pH-Effekte qualitativ ebenso wie in normaler Luft (Tab. 3). Quantitativ könnte man aus diesen Daten eine Erniedrigung des Effektes durch das Entfernen des CO_2 aus dem Luftstrom herauslesen. Die Aussagekraft des Vergleichs der Daten ist aber insofern beeinträchtigt, als sich die pH-Effekte in CO_2 -freier Luft immer nur bei höheren pH-Werten auslösen ließen als die Kontrollen in Luft und dadurch die Effekte entsprechend Abb. 2 b kleiner sein könnten, ohne daß die CO_2 -Abwesenheit selbst eine Rolle

	Licht an pH beim Aus- lösen	peq H ⁺ mg Chl.	Licht aus pH beim Aus- lösen	peq H ⁺ mg Chl.
<i>Versuch 1</i>				
Luft	6,78	+ 590	7,25	— 845
	6,71	+ 681	7,12	— 907
CO ₂ -freie Luft	7,50	+ 84	7,66	— 171
	7,47	+ 142	7,78	— 160
<i>Versuch 2</i>				
Luft	7,21	+ 344	7,49	— 554
CO ₂ -freie Luft	7,70	+ 149	8,11	— 224
	7,60	+ 183	—	—
<i>Versuch 3</i>				
Luft	6,65	+1280	6,75	—1390
CO ₂ -freie Luft	7,23	+ 615	—	—

Tab. 3. pH-Änderungen des Milieus von *Zea mays*-Blattgewebe bei Begasung des Küvetteninhalts mit Luft und CO₂-freier Luft (+ = H⁺-Aufnahme, — = H⁺-Abgabe des Gewebes).

spielt. Auch der von BEN-AMOTZ u. GINZBURG⁶ im Medium von *Dunaliella* bei Belichtung und Verdunkelung beobachtete pH-Effekt war unabhängig von der Anwesenheit von CO₂. Andererseits ist nach CUMMINS et al.⁵ das Vorhandensein von Bicarbonat eine Voraussetzung für lichtinduzierte Protonenfluxe bei intakten *Ulva*-Zellen.

Versuche mit Elektronentransport-defekten Zellen

Grünes Leitbündelscheidengewebe von *Zea mays*, bei dem die Lichtreaktion II der Photosynthese inaktiv ist⁸, und die Mutante BISHOP 11 von *Scenedesmus*

desmus obliquus, die kein Photosystem II besitzt, zeigen den pH-Effekt nicht. Mit dem normalen Stamm von *Scenedesmus obliquus* (Stamm GAFFRON D3), bei dem beide Lichtreaktionen aktiv sind, findet man den lichtabhängigen pH-Effekt in der typischen Weise (Abb. 4).

Diskussion

Die Ursache der Licht-ausgelösten pH-Änderungen im Milieu intakter Zellen

Die hier beschriebene, vorübergehende rasche Protonenaufnahme (oder OH⁻-Abgabe) beim Lichteinschalten und die gleich große Protonenabgabe (oder OH⁻-Aufnahme) beim Lichtausschalten hängt mit großer Wahrscheinlichkeit mit dem Ein- und Ausschalten des photosynthetischen, nichtzyklischen Elektronentransportes zusammen:

1. Der Effekt ist unabhängig von dem Ionen-gehalt des Mediums (s. auch l. c.⁷), er kann deshalb nicht durch Ionenaustauschpumpen¹³ bedingt sein.

2. Grüne Pflanzenzellen mit defektem Photosystem II (Leitbündelscheidenzellen von Maisblättern, PS II-defekte *Scenedesmus*-Mutante) zeigen den Effekt nicht, er kann also nicht durch den zyklischen Elektronenfluß zustande kommen.

3. DCMU-Zugabe hat die gleiche Wirkung wie Verdunkelung.

Damit läßt sich aber noch keine Entscheidung darüber treffen, ob dieser Zusammenhang indirekter Natur (Aufnahme von CO₂ als HCO₃⁻ und Freisetzen eines OH⁻-Ions bei der CO₂-Assimilation bzw. CO₂-Abgabe bei der Respiration^{7, 14, 15}) oder eine unmittelbare Folge der Protonenpumpe der Thylakoide ist, indem sich die Licht-bedingte Veränderung von H⁺-Gradienten an den Thylakoidmembranen über die Chloroplastenhülle hinweg bis zum Plasmalemma hin fortpflanzt^{2-4, 6}.

Als Hinweis auf einen indirekten Zusammenhang zwischen Elektronentransport und pH-Effekt dient die Tatsache, daß vielfach ein molares Verhältnis von

$$\Delta[\text{H}^+]: \text{O}_2\text{-Entwicklung bzw. -Aufnahme:} \\ \text{CO}_2\text{-Fixierung bzw. -Abgabe} = 1:1:1$$

gefunden wird¹⁵; eigene unveröffentlichte Ergebnisse), und daß der pH-Effekt bei einer Carboxydismutase-defekten *Chlamydomonas*-Mutante bei in-

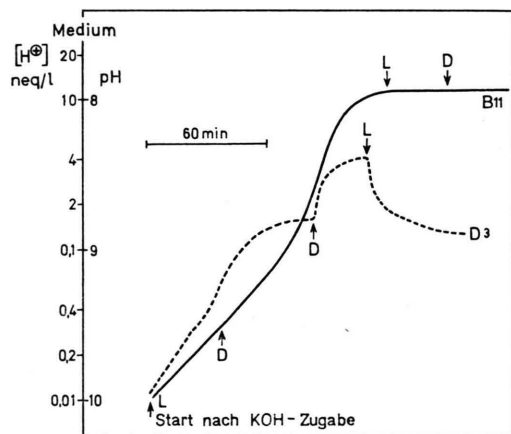


Abb. 4. pH-Änderungen bei *Scenedesmus obliquus*. Nach Zugabe von einigen Tropfen 0,1 N KOH bis pH 10 wurde der Versuch gestartet. D3 (---) = normale Algen, B11 (—) = mutierte Algen ohne Photosystem II. L = Licht an, D = Licht aus.

taktem photosynthetischen Elektronentransport ausbleibt⁷ (s. auch l. c.¹⁶). Bei allen diesen Versuchen wurden die pH-Messungen im geschlossenen System durchgeführt, das sich wesentlich von dem hier beschriebenen offenen System mit kräftiger Begasung unterscheidet (s. u.). Ferner machen Befunde von KRAUSE und HEBER¹⁷, daß die äußere Hülle intakter Chloroplasten für Protonen impermeabel ist, die Annahme einer direkten Koppelung mit der Protonenpumpe der Thylakoide schwierig. Mit isolierten Chloroplastenfragmenten (Thylakoiden) der Carboxydismutase-defekten *Chlamydomonas*-Mutante läßt sich der bei intakten Zellen fehlende pH-Effekt ohne weiteres nachweisen.

Diese Beobachtungen sprechen alle für einen indirekten Zusammenhang von Elektronentransport und pH-Änderung im Milieu intakter Zellen. Weniger beweiskräftige Argumente in diesem Sinne sind die größere lag-Phase und die verlängerte Halbwertszeit des pH-Effektes bei intakten Zellen gegenüber isolierten Thylakoiden⁷, die auch durch die Fortsetzung der Gradienten über mehrere Membranen hinweg bedingt sein könnten. Ebenso kann die FCCP-(Entkoppler-)Hemmung der transitorischen pH-Änderungen sowohl durch eine verminderte CO₂-Fixierung (ATP-Bereitstellung!) als auch nach der Mitchell-Hypothese durch rasches Entladen der bei der Ladungstrennung an den Thylakoidmembranen entstandenen Potentiale erklärt werden. Auch die pH-Abhängigkeit des Effektes wird bei beiden Erklärungsmöglichkeiten verständlich.

Der Befund, daß der pH-Effekt bei Begasung mit reinem Stickstoff nicht auftritt (diese Arbeit; l. c.^{7,12}), steht ebenfalls mit der Annahme der HCO₃[⊖]-Aufnahme und CO₂-Fixierung als Ursache in Einklang. Der pH-Effekt sollte dann aber in N₂ + CO₂ zu beobachten sein, was im Versuch von JESCHKE¹² jedoch nicht der Fall war. Daß der pH-Effekt auch bei kräftiger Begasung mit Luft zu messen ist, wodurch der HCO₃[⊖]/CO₂-Gehalt des Milieus konstant gehalten werden sollte, scheint dieser Erklärung ebenfalls zu widersprechen. Dabei ist die von uns im offenen System bei Begasung mit Luft beobachtete pH-Änderung im Milieu (max. ca. 4 neq/mg Chlorophyll) aber sehr viel geringer als die im geschlossenen System gefundenen Werte (bis ca. 6 µeq/mg Chlorophyll bei *Chlamydomonas*⁷, ca. 10 µeq/mg Chlorophyll bei *Dunaliella*⁶). Da die HCO₃[⊖]-Konzentration Luft-gesättigten Wassers z. B. bei 25 °C und pH 6,5 etwa 600 nMol/l beträgt

(s. l. c.¹⁸), ist es bei einer durchschnittlichen Photosyntheserate von ca. 600–800 nMol CO₂·min⁻¹·g Fr.-Gew.⁻¹ unter den gewählten Bedingungen durchaus möglich, daß trotz der starken Belüftung der Küvette die Photosyntheseleistung von 1 g Gewebe in 30 ml Lösung innerhalb weniger Minuten zu geringen Änderungen der HCO₃[⊖]-Konzentration führt und die beobachtete maximale pH-Veränderung von 4 neq H[⊖] pro g Fr.-Gew. in 30 ml Lösung (Abb. 3 a) verursacht.

Auch die Tatsache, daß die pH-Änderungen, wenn vielleicht auch in etwas vermindertem Maße, in CO₂-freier Luft beobachtet werden können, scheint gegen ihre ausschließliche Verursachung durch eine durch photosynthetische CO₂-Fixierung bedingte HCO₃[⊖]-Aufnahme und OH[⊖]-Abgabe zu sprechen. Dabei wissen wir allerdings nicht genau, inwieweit hier respiratorisch gebildetes CO₂ quantitativ eine Rolle spielen kann.

Vergleich der pH-Änderungen mit anderen Licht-ausgelösten transitorischen Signalen intakter Zellen

Obwohl sich gegenwärtig kein eindeutiger Beweis dafür finden läßt, ist es doch nicht ausgeschlossen und erscheint weiterhin bemerkenswert, daß sich neben CO₂-Fixierungs-abhängigen pH-Änderungen auch Elektronentransport-bedingte H[⊖]-Verschiebungen am Plasmalemma auswirken. Es ist wichtig zu betonen, daß wir hier ein transitorisches Phänomen diskutieren. Im Dauerlicht und im Dauerdunkel war bei unseren Versuchen der H[⊖]-Nettoflux entweder gleich Null oder hatte einen bestimmten Wert unabhängig von der Beleuchtung. Auch das Ruhemembranpotential, dessen Licht-ausgelöste transitorische Veränderungen mit den H[⊖]-Verschiebungen zeitlich korreliert sind, war in vielen unserer früher beschriebenen Versuche im Dauerlicht und im Dauerdunkel annähernd gleich groß^{2,19}.

Wir haben das Wirken eines Regulationsmechanismus noch unbekannter Natur angenommen, um die Einstellung des gleichen Potentialniveaus nach vorübergehender Auslenkung zu erklären^{2,4}.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß auch der ATP-Spiegel Licht-ausgelösten transitorischen Schwankungen ausgesetzt zu sein scheint^{20–22}. Wir konnten diese vorübergehenden Änderungen des ATP-Spiegels an Mais-Blattgewebe auch für unsere Versuchsbedingungen bestätigen (Abb. 5). Es läßt sich zeigen, daß der ATP-Spiegel bei Ein-

schalten des Lichtes ansteigt und nach 30–60 sec ein Maximum erreicht; danach geht der ATP-Gehalt entweder direkt (Abb. 5 b, c, e) oder nach Durchlaufen eines Minimums (Abb. 5 a, d) auf ein mehr oder weniger gleichbleibendes Niveau zurück. Bei Verdunkelung senkt sich der ATP-Spiegel vorübergehend und stellt sich dann auf ein Niveau ein (Abb. 5 a, c–e). Dabei können wieder Nachschwingungen auftreten (Abb. 5 b), die – wie im

Licht – Ähnlichkeit mit den bekannten durch Beleuchtungswechsel ausgelösten Oszillationen des Membranpotentials verschiedener Pflanzenzellen haben². Nach LÜTTGE et al.¹¹ enthält Mais-Blattgewebe im Dauerlicht 69 ± 8 , im Dauerdunkel 76 ± 3 nMol ATP/g Trockengewicht, wobei die Belichtungs- bzw. Verdunkelungsdauer jeweils 3 Stdn. betrug. Erst in derartigen länger dauernden Versuchen kann man zeigen, daß sich der ATP-Spiegel nach

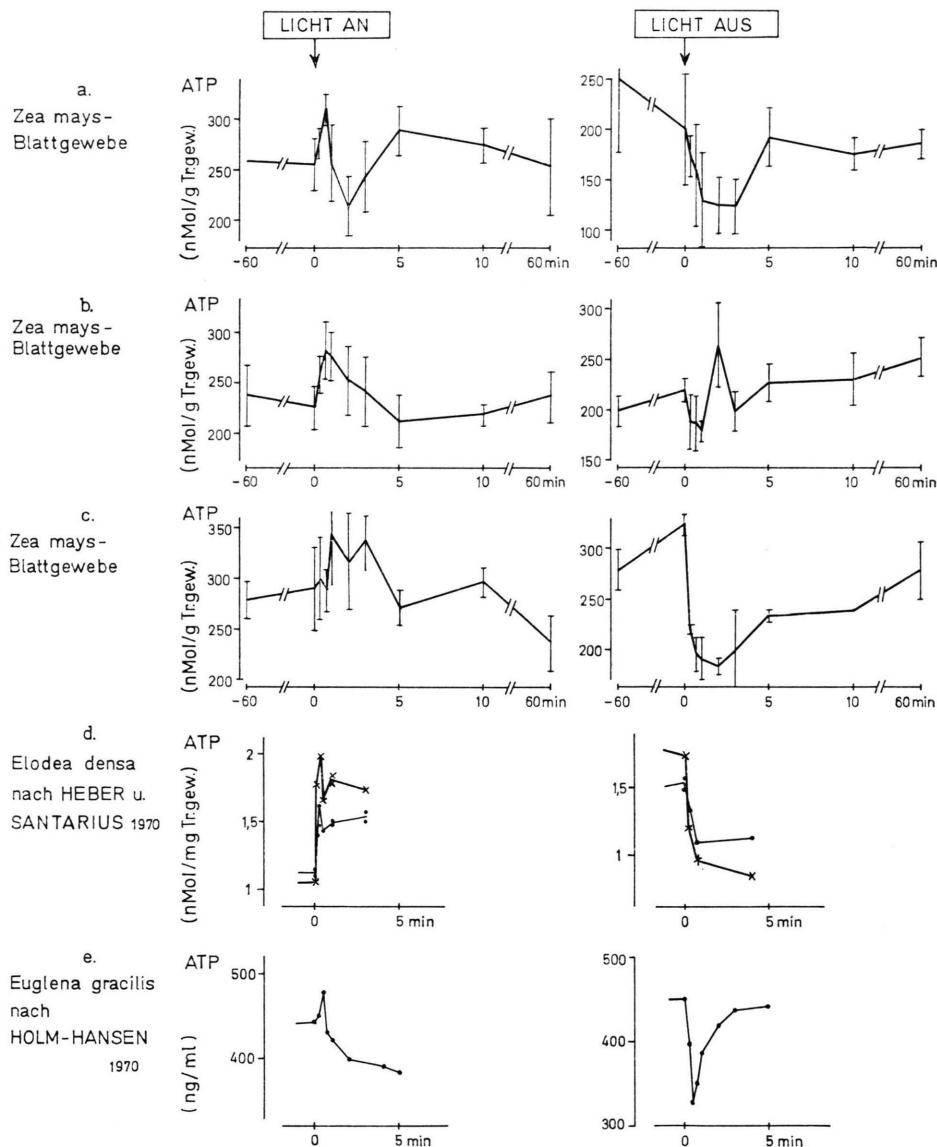


Abb. 5. Vorübergehende Änderungen des ATP-Spiegels verschiedener Pflanzenzellen und Gewebe nach Einschalten und Ausschalten des Lichtes. a) – c) *Zea mays*-Blattgewebe: ATP-Gehalt in nMol/g Trockengewicht $\pm$ Standardfehler ($n = 2-4$); d) *Elodea densa*: ATP-Gehalt in Chloroplasten (x) und im Cytoplasma (●), nach HEBER u. SANTARIUS²²; e) *Euglena gracilis*, nach HOLM-HANSEN²¹.

einer kurzzeitigen Änderung wieder auf ein sehr ähnliches Niveau einstellt wie vor dem Beleuchtungswechsel (Abbn. 5 a – c) ^{10, 23}.

Die Höhe von Membranpotentialen lebender Zellen konnte unmittelbar mit dem ATP-Niveau korreliert werden ²⁴, wobei wohl energetische Zusammenhänge entscheidend sind ²⁵. Das vorübergehende Ansteigen des ATP-Spiegels nach Einschalten des Lichtes muß aber auch mit einem H^+ -Verbrauch und das Absinken des ATP-Spiegels nach Ausschalten des Lichtes mit einer H^+ -Bildung (Hydrolyse!) im Innern der Zellen gekoppelt sein. Dies kann ebenfalls zur Erklärung der H^+ -Verschiebungen am Plasmalemma dienen. Quantitative Erwägungen sind erschwert, weil wir keine Angaben über den für die Dissoziation der ionischen Gruppen von ATP, ADP und AMP wichtigen pH-Wert in den relevanten Zellkompartimenten haben.

Der oben erwähnte Regulationsmechanismus kann in einer Regulation zwischen Atmungsketten- und Photophosphorylierung bestehen. Zudem ist zu bedenken, daß beim photosynthetischen Elektronentransport nach der Mitchell-Hypothese H^+ -Ionen in die Thylakoide aufgenommen, d.h. aus dem Cytoplasma entfernt werden, während bei der Respiration umgekehrt H^+ -Ionen ins Medium der Mitochondrien abgegeben werden ²⁶. Es ist vielleicht

falsch, die hier diskutierten Licht-ausgelösten Übergangsphänomene allein als Photosynthese-an- bzw. Photosynthese-aus-Effekte anzusehen; man sollte vielmehr gleichzeitig auch Veränderungen der Respirationsrate in Betracht ziehen. Die Notwendigkeit von O_2 (kein Effekt in N_2 , aber positiver Effekt in CO_2 -freier Luft) gibt hierzu vielleicht einen Hinweis.

Eine Reihe weiterer Signale von mehr oder weniger ähnlicher Kinetik, bei denen H^+ -Ionen eine Rolle spielen können, lassen sich nach Licht-Dunkel-Wechseln mit intakten grünen Pflanzenzellen beobachten; z.B. das Schwellen und Schrumpfen der Chloroplasten, das mit der Protonierung der Membranen zusammenhängen soll ^{27–29}, oder transitorische Änderungen des Reduktionsniveaus der Pyridinnukleotide ³⁰. Eine synoptische Analyse dieser verschiedenen transitorischen Phänomene verspricht interessante Einblicke in die Koppelung unterschiedlicher Ereignisse – wie die Energieübertragung an den Organellenmembranen, der Membranpotentiale und Ionenfluxe – in intakten grünen Zellen.

Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Wir danken Frau GABRIELE KINZE für die gewissenhafte Durchführung der ATP-Messungen und Frau DORIS SCHÄFER für die Ausführung der Illustrationen.

- ¹ L. PACKER, S. MURAKAMI u. C. W. MEHARD, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **21**, 271 [1970].
- ² U. LÜTTGE u. C. K. PALLAGHY, *Z. Pflanzenphysiol.* **61**, 58 [1969].
- ³ W. J. VREDENBERG, *Progr. in Phot. Res.*, vol. **II**, 923 [1969].
- ⁴ C. K. PALLAGHY u. U. LÜTTGE, *Z. Pflanzenphysiol.* **62**, 417 [1970].
- ⁵ J. T. CUMMINS, J. A. STRAND u. B. E. VAUGHAN, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **173**, 198 [1969].
- ⁶ A. BEN-AMOTZ u. Z. GINZBURG, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **183**, 144 [1969].
- ⁷ J. NEUMANN u. R. P. LEVINE, *Plant Physiol.* **47**, 700 [1971].
- ⁸ K. C. WOO, J. M. ANDERSON, N. K. BOARDMAN, W. J. S. DOWNTON, C. B. OSMOND u. S. W. THORNE, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **67**, 18 [1970].
- ⁹ D. I. ARNON, *Plant Physiol.* **24**, 1 [1949].
- ¹⁰ A. PRADET, *Physiol. Vég.* **5**, 209 [1967].
- ¹¹ U. LÜTTGE, E. BALL u. K. v. WILLERT, *Z. Pflanzenphysiol.* **65**, 326 [1971].
- ¹² W. D. JESCHKE, *Z. Pflanzenphysiol.* **62**, 158 [1970].
- ¹³ F. A. SMITH, *New Phytol.* **69**, 903 [1970].
- ¹⁴ P. DENNY u. D. C. WEEKS, *Ann. Bot.* **34**, 483 [1970].
- ¹⁵ C. A. ATKINS u. D. GRAHAM, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **226**, 481 [1971].
- ¹⁶ S. SCHULDINER u. I. OHAD, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **180**, 165 [1969].
- ¹⁷ U. HEBER u. G. H. KRAUSE, in M. D. HATCH, B. C. OSMOND, and R. O. SLATYER, *Photosynthesis and Photorespiration*, Wiley Interscience, p. 218, New York 1971.
- ¹⁸ F. GESSNER, *Hydrobotanik II*, pp. 189–191 u. Abb. 120, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1959.
- ¹⁹ C. B. OSMOND, U. LÜTTGE, K. R. WEST, C. K. PALLAGHY u. B. SHACHER-HILL, *Austral. J. biol. Sci.* **22**, 797 [1969].
- ²⁰ K. A. SANTARIUS u. U. HEBER, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **102**, 39 [1965].
- ²¹ O. HOLM-HANSEN, *Plant and Cell Physiol.* **11**, 689 [1970].
- ²² U. HEBER u. K. A. SANTARIUS, *Z. Naturforsch.* **25b**, 718 [1970].
- ²³ F. A. ISHERWOOD u. R. R. SELVEDRAN, *Phytochem.* **10**, 579 [1971].
- ²⁴ C. L. SLAYMAN, C. Y. H. LU u. L. SHANE, *Nature* [London] **226**, 274 [1970].
- ²⁵ D. GRADMANN, *Planta* **93**, 323 [1970].
- ²⁶ R. N. ROBERTSON, *Protons, Electrons, Phosphorylation, and Active Transport*, Cambridge Univ. Press, London 1968.
- ²⁷ S. MURAKAMI u. L. PACKER, *Plant Physiol.* **45**, 289 [1970].
- ²⁸ L. PACKER, A. C. BARNARD u. D. W. DEAMER, *Plant Physiol.* **42**, 283 [1967].
- ²⁹ U. HEBER, *Biochim. biophys. Acta* [Amsterdam] **180**, 302 [1969].
- ³⁰ U. HEBER u. K. A. SANTARIUS, *Biochim. biophys. Acta* [Amsterdam] **109**, 390 [1965].