

Transport und Verteilung von markierten Substanzen V*

Über die Natur der transportierten Kohlehydrate bei *Phaseolus multiflorus*

Von

R. BACHOFEN

Aus dem Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich
Direktion: Prof. Dr. H. WANNER

Einleitung

Das Problem der chemischen Natur der organischen Transportstoffe in Siebröhren von Pflanzen beschäftigt Pflanzenphysiologen schon seit über 100 Jahren. HARTIG (1860) gewann erstmals Phloemsaft, indem er die Rinde verschiedener Bäume anschnitt. Er fand bei der anschliessenden Untersuchung: «Es enthält derselbige geringe Mengen beim Aufkochen sich ausscheidende stickstoffhaltige Körper, keinen Gummi, aber zwischen 25 und 33 % Zucker sehr verschiedener Art und Kristallform, theils süss und dem Rohrzucker in der Kristallform ähnlich, aber auch in abweichender Form kristallinisch sich ausscheidend (zum Beispiel bei Akazie in sphaerischen Tetradern), theils geschmacklos (Mannit).»

Auch in neuerer Zeit wurde diese Methode der Saftgewinnung noch häufig angewandt, so von MÜNCH (1930), CRAFTS (1939), WANNER (1953), ZIEGLER (1956) und ZIMMERMANN (1957). Die drei letztgenannten Autoren bedienten sich der Papierchromatographie als Untersuchungsmethode und kamen damit gegenüber früheren Forschern zu feineren Resultaten. Obwohl bei der Gewinnung von Phloemsaft durch Anschneiden der Baumrinde die Gefahr besteht, dass der austretende Saft durch den Zellinhalt angeschnittener Rindenzellen verunreinigt wird, fanden WANNER (1953) und ZIEGLER (1956) an insgesamt 12 verschiedenen europäischen Bäumen im austretenden Saft nur Saccharose als Wanderzucker. Hexosen und Hexosephosphate konnten auch in Spuren nicht nachgewiesen werden. ZIMMERMANN (1957) untersuchte 16 amerikanische Baumarten und fand als Transportform neben der meist dominierenden Saccharose auch die galaktosehaltigen Zucker Raffinose, Stachyose und Verbascose. Reduzierende Zucker fehlten auch hier.

* Transport und Verteilung von markierten Substanzen IV: Direkte Messung der Transportgeschwindigkeit mit Isotopen, von R. BACHOFEN und H. WANNER, erscheint in *Planta*, 1962.

Die geschilderte Art der Gewinnung von Phloemsaft ist nur bei verholzten Dikotylen möglich. Um auch an unverholzten Pflanzen Phloemsaft untersuchen zu können, verwendete MITTLER (1957) Blattläuse, welche die Siebröhren anstechen. Nach dem Abschneiden des Rüssels der Tiere kann der austretende Saft noch während Stunden gewonnen und damit die Zusammensetzung des Inhaltes einzelner Siebröhren analysiert werden; für kurzzeitige quantitative Untersuchungen sind die austretenden Mengen allerdings etwas gering. Auch mit dieser Methode konnten von verschiedenen Autoren (MITTLER, 1958; ZIEGLER und MITTLER, 1959; WEATHERLEY et al., 1959) nur Saccharose und Spuren von Raffinose gefunden werden.

Andere Autoren (ENGARD, 1939; TURNER, 1960) versuchten die Natur des Transportzuckers zu ermitteln, indem sie Zweige ringelten und nach einer gewissen Zeit die Verteilung der einzelnen Kohlehydrate ober- und unterhalb der Ringelungsstelle untersuchten. Bei beiden Autoren wurde die Konzentration der Saccharose durch Ringelung am meisten beeinflusst; im Phloem, aber auch im Xylem staute sich diese oberhalb der Ringelungsstelle am stärksten.

In neuerer Zeit wurden für die Lösung dieses Problems auch Isotope verwendet. VERNON und ARONOFF (1952) untersuchten nach ^{14}C -Fütterung an Blätter von Soja die entstandenen markierten Verbindungen in den einzelnen Organen. So waren in Stengeln nur Saccharose, Glucose und Fructose markiert. Das Verhältnis zwischen Saccharose und den Hexosen (97:3) zeigte, dass Saccharose als Hauptform des Zuckertransportes angenommen werden muss. Ähnliche Versuche wurden von SWANSON und EL SHISHINY (1958) an Reben durchgeführt. Bei dieser verholzten Pflanze untersuchten die beiden Autoren Xylem und Phloem getrennt auf markierte Saccharose, Glucose und Fructose. Es zeigte sich dabei, dass die beiden markierten Hexosen in der ganzen Sprossachse im 1:1-Verhältnis vorkamen und ihre Menge im Vergleich zur Saccharose sich mit dem Abstand von der Fütterungsstelle verkleinerte. Da es bei dieser Methode nicht möglich ist, reinen Phloemsaft zu gewinnen, wurden Extrakte ganzer Gewebe oder Organe bearbeitet. Auf Grund dieser Tatsachen schlossen SWANSON und Mitarbeiter, dass die Hexose durch Spaltung aus der transportierten Saccharose ausserhalb des Leitgewebes entstanden sein müsse und letztere als alleiniger Transportzucker zu betrachten ist.

Über die Transportform der Assimilate in *Phaseolus* berichtete MEYER-MEVIUS, dass neben Saccharose auch Glucose und Fructose in ähnlichen Mengen im Phloemsaft vorliegen sollen. Da dies im Widerspruch zu den an andern Leguminosen gefundenen Resultaten von VERNON und ARONOFF steht, schien es uns wertvoll, diese Frage im Zusammenhang mit dem Transport von Assimilaten in Früchte (WANNER und BACHOFEN, 1961; BACHOFEN und WANNER, 1961) zu überprüfen.

Methodik

Pflanzen von *Phaseolus multiflorus* var. *nana*, die während 6—7 Wochen im Treibhaus gezogen wurden, fütterten wir über das jüngste trifoliolate Blatt während verschiedenen Zeiten (1—4 Stunden) mit ^{14}C (vgl. genaue Methodik bei WANNER und BACHOFEN, 1961). Bei Versuchsabbruch zerlegten wir die Pflanze und extrahierten die einzelnen Organe nach Zerkleinerung in kochendem 70%igem Alkohol. Den Extrakt

behandelten wir mit Dowex 50, um Kationen und Aminosäuren zu entfernen, dampften im Rotationsverdampfer bei 40° ein und chromatographierten aliquote Teile auf Whatman 1 mit dem Fließmittel Äthylacetat-Eisessig-Wasser (3 : 1 : 3, organische Phase). Nach 30 Stunden konnten von den Chromatogrammen auf Agfa-Röntgenpapier Autoradiographien erstellt werden.

Die durch die Radiographie ermittelten Zuckerflecken wurden eluiert und je zum Teil zur quantitativen Bestimmung der Aktivität und des Zuckergehaltes verwendet. Die Messung der Aktivität erfolgte auf Glasplättchen im Methandurchflusszähler (FRIESEKE und HOEPFNER 90+901), während der Zuckergehalt nach der Antronomie im Beckman bestimmt wurde. Für die sorgfältige Mithilfe bei Analysen möchten wir Frl. E. KÖHLE bestens danken, ebenso der Atomforschungskommission des Schweizerischen Nationalfonds für die finanzielle Unterstützung.

Ergebnisse

a) Der alkohollösliche Anteil der markierten Verbindungen

Die in den mit ^{14}C gefütterten Blättern gebildeten markierten Verbindungen werden sehr rasch fixiert. Nach VERNON und ARONOFF (1952) sind bereits nach 20 Minuten 25% der markierten C-Verbindungen als Stärke und in geringem Masse auch als Zellulose gebunden. In unseren Versuchen konnte keine eindeutige Abhängigkeit der Fixierungsrate von der Fütterungsdauer festgestellt werden. Vielmehr zeigte sich eine deutliche Beziehung zum Alter des gefütterten Blattes. Obwohl nur Pflanzen mit voll entfaltetem oberstem (= drittem) trifoliatem Blatt verwendet wurden, waren Unterschiede offensichtlich. Die Fixierung in kleineren Blättern (Trockengewicht 50 bis 100 mg) war kleiner als in grossen (TG 200—300 mg). In den ersteren waren nach 4 Stunden zum Beispiel 33% der gebildeten markierten Verbindungen in Alkohol unlöslich, während in älteren, grossen Blättern schon nach 1—2 Stunden die Fixierung bis gegen 70% gehen konnte.

In Früchten erfolgte eine fortschreitende Fixierung mit steigender Versuchsdauer, wie zu erwarten war. Während nach 1 Stunde bei einer Frucht, die 95 mm vom gefütterten Blatt entfernt lag, erst 4% markierter C-Verbindungen in fixierter Form vorlagen, erhöhte sich dieser Anteil nach 2 Stunden auf 40% und nach 4 Stunden schliesslich auf 48%.

In den Leitorganen (Internodien) war die Fixierung erwartungsgemäss gering. Gegenüber den von VERNON und ARONOFF nach 20 Minuten gemachten Angaben von 4,6% erhöhten sich unsere Werte bis gegen 15% bei den längeren Versuchszeiten. In nahe der Fütterungsstelle gelegenen Internodien war die Fixierung deutlicher ausgeprägt als in entfernteren Stengelteilen.

Der Blattstiel des gefütterten Blattes zeigte dagegen einen bedeutend höheren Fixierungsgrad als die oben genannten Leitorgane. Unabhängig von der Zeitdauer der Verabreichung des Tracers fanden wir darin zwischen 21 und 36% der markierten C-Verbindungen in unlöslicher Form vor. Diese Abweichung ist darauf zurückzuführen, dass sich bei unserer Versuchsanordnung ein mehr oder weniger grosser Teil des Blattstiels in der Fütterungsküvette befand und damit durch Assimilation befähigt war, selbst aktiven Kohlenstoff einzubauen.

b) Die radioaktiven Produkte (Kohlehydrate)

Wie Abb. 1 zeigt, finden sich im gefütterten Blatt eine grosse Zahl radioaktiv markierter Verbindungen. Nach VERNON und ARONOFF sind schon nach 20 Minuten neben Kohlehydraten eine ganze Anzahl von Aminosäuren und organischen Säuren markiert. Da bei unseren Versuchen die Extrakte vor dem Chromatographieren mit Ionenaustauscher behandelt wurden, zeigen die Chromatogramme in Abb. 1 nur die verschiedenen markierten, mit Alkohol extrahierbaren Kohlehydrate. Im gefütterten Blatt sind neben den deutlich hervortretenden Verbindungen Saccharose, Glucose, Fructose, vor allem auch Raffinose und nicht näher untersuchte Pentosen markiert. In den verschiedenen Stengelstücken sind neben der dominierenden Saccharose nur geringe Mengen anderer Kohlehydrate vorhanden; in ungefähr gleicher absoluter Aktivität liegen die Spaltprodukte des Rohrzuckers, Glucose und Fructose und das Trisaccharid Raffinose vor.

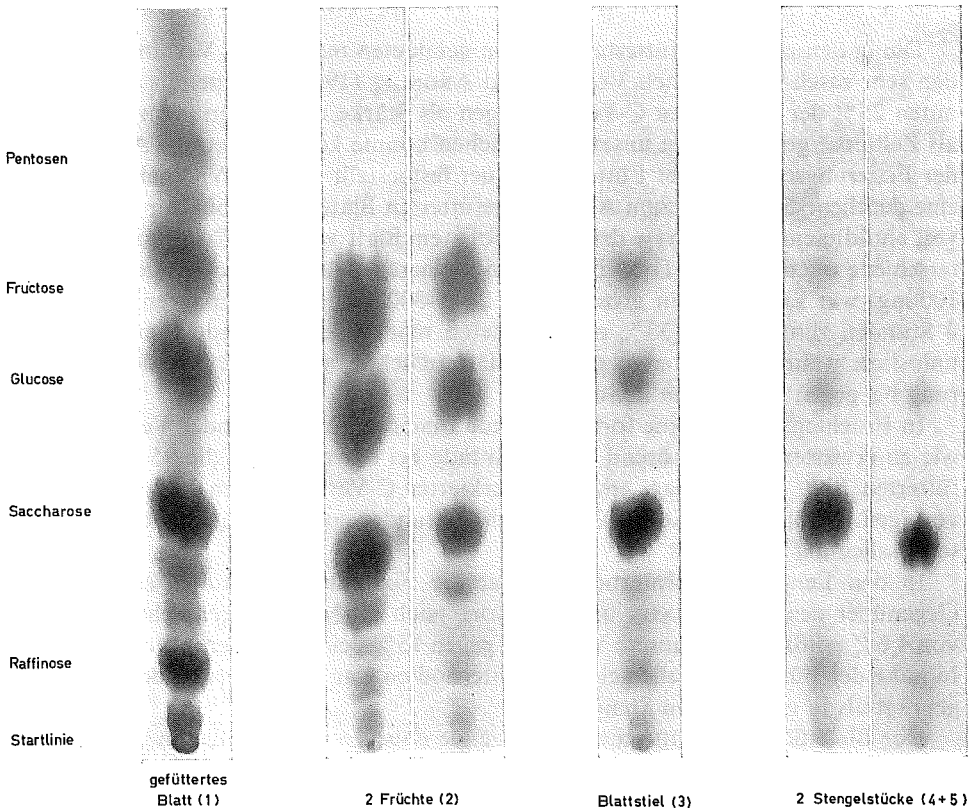


Abb. 1. Radiogramm eines Chromatogramms von Extrakten (nach Behandlung mit Ionenaustauscher) verschiedener Organe von Pflanzen von *Phaseolus multiflorus*. Laufmittel des Chromatogramms: Äthylacetat-Eisessig-Wasser, 3 : 1 : 3, organische Phase. Exposition des Röntgenfilms 7 Tage. Ziffern wie in Abb. 2.

Von den genannten Zuckern zeigt Saccharose die höchste spezifische Aktivität, dicht gefolgt von Raffinose, deren absolute Konzentration im Vergleich zur Saccharose bedeutend geringer ist. Die spezifischen Aktivitäten von Glucose und Fructose liegen in dem der Fütterungsstelle nahen Leitorgan (Blattstiel) bei 22% derjenigen der Saccharose; mit wachsender Entfernung von der Fütterungsstelle findet eine Abnahme des Verhältnisses Saccharose-Hexosen statt (17,5%, 13,1%, 10,5% in den folgenden Internodien, vgl. Abb. 2). Wie dies von SWANSON und EL SHISHINY formuliert wurde, lässt diese Tatsache den Schluss zu, dass auch bei *Phaseolus* Glucose und Fructose nicht als solche transportiert werden, sondern dass sie in den Geweben ausserhalb der Leitungsbahnen sekundär entstanden sein müssen.

Die spezifische Markierung der Zucker Saccharose, Glucose und Fructose ist in Früchten von ähnlicher Grösse.

c) Verlauf der Radioaktivität längs der Hauptachse

Wie von verschiedenen Autoren festgestellt wurde (vgl. Zusammenfassung bei CANNY, 1960), nimmt die Aktivität in der Hauptachse mit der Entfernung von der Fütterungsstelle logarithmisch ab (Abb. 2). Die Verteilungskurve kann durch die Gleichung

$$\log r = -b \cdot d$$

umschrieben werden, wobei r die Aktivität in der Distanz d von der Fütterungsstelle bedeutet. Die Neigung der Geraden, b , lag bei unseren Versuchen zwischen 0,091 und 0,128 cm^{-1} ; diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit dem Mittelwert 0,11 cm^{-1} , den CANNY (1960) unter Zuhilfenahme von Arbeiten verschiedener Autoren errechnete.

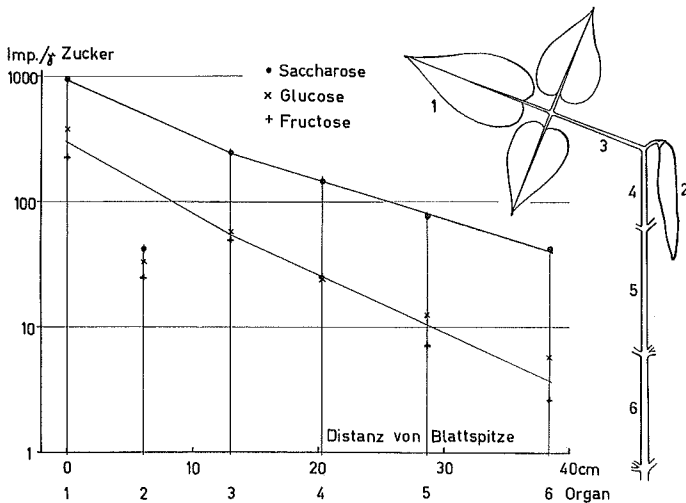


Abb. 2. Spezifische Aktivitäten (Impulse pro γ Zucker) von Saccharose, Glucose und Fructose im gefütterten Blatt (1), Blattstiel (3), den folgenden 3 Internodien (4—6) und der in der Achsel des gefütterten Blattes stehenden Frucht (2). Abszisse = Längen der Internodien.

Seitliche Organe wie Früchte oder Verzweigungen scheinen auf die logarithmische Verteilung der Aktivität in der Hauptachse von untergeordneter Bedeutung zu sein, auch wenn grosse Teile der Aktivität bei den betreffenden Knoten seitlich abgeleitet werden.

Diskussion

Obwohl es mit der beschriebenen Methode nicht möglich ist, nur den Extrakt der Assimilatleitungsbahnen zu gewinnen, kann auf Grund unserer Untersuchungen bei *Phaseolus* eindeutig die Saccharose als Transportzucker bezeichnet werden. Wie von ZIMMERMANN an verschiedenen Bäumen gefunden wurde, scheint auch hier Raffinose als Transportzucker vorzukommen, zeigte sie doch eine der Saccharose entsprechende, hohe spezifische Aktivität. Mengenmässig ist Raffinose von untergeordneter Bedeutung. Glucose und Fructose entstehen, wie sich aus dem abnehmenden Verhältnis zur Saccharose mit zunehmender Entfernung vom Fütterungsort ableiten lässt, ausserhalb des Leitgewebes und werden nicht transportiert. Damit können die Angaben von MEYER-MEVIUS für *Phaseolus* als widerlegt betrachtet werden.

Etwas unerwartet war die Feststellung, dass Früchte seitlich an der Hauptachse sich auf die logarithmische Verteilung längs der Hauptachse nicht auswirkten, obwohl sie meist den grössten Teil der aus dem gefütterten Blatt auswandernden Stoffe aufzunehmen vermögen. Dieser Befund kann nur so erklärt werden, dass die Transportgeschwindigkeit in den verschiedenen Abschnitten des Stengels von ungleicher Grösse ist, dass zum Beispiel im Blattstiel grössere Geschwindigkeiten vorkommen müssen als in der Hauptachse und dass sie im oberen Teil derselben grösser sein muss als im unteren. Weitere Versuche vermögen diese Frage vielleicht zu klären.

Zusammenfassung

Pflanzen von *Phaseolus multiflorus* wurden während 1—4 Stunden über das jüngste trifoliolate Blatt mit radioaktivem CO₂ versorgt. Die Fixierung des Kohlenstoffs erfolgte im gefütterten Blatt sehr rasch (zum Teil bis 70% in einer Stunde), während in Früchten nach 4 Stunden noch rund die Hälfte der markierten Kohlenstoffverbindungen in 70% Alkohol löslich waren. In Leitorganen lag der Fixierungsgrad zwischen 5 und 15% je nach Fütterungsdauer.

Als Transportzucker konnte eindeutig Saccharose bestimmt werden; auf Grund der hohen spezifischen Markierung darf auch Raffinose als Transportform von Kohlehydraten angenommen werden.

Die Radioaktivität nimmt in der Hauptachse logarithmisch ab. Seitliche Organe scheinen die logarithmische Verteilung nicht zu beeinflussen.

Literatur

- BACHOFEN, R. und WANNER, H.: Transport und Verteilung von markierten Substanzen II, Über die Transportbahnen von Assimilaten in Fruchtstielen von *Phaseolus*. Planta 1962, im Druck.
CANNY, M. J.: The rate of translocation. Biol. Reviews 35, 1960, 507—532.

- CRAFTS, A. S.: The relation between structure and function of the phloem. *Am. J. Bot.* 26, 1939, 172—177.
- ENGARD, C. J.: Translocation of Carbohydrates in the Cuthbert Raspberry. *Bot. Gaz.* 100, 1939, 439—464.
- HARTIG, Th.: Beiträge zur physiologischen Forstbotanik. *Allgem. Forst- und Jagdzeitung* 36, 1860, 257—261.
- MEYER-MEVIUS, U.: Vorkommen und Transport von Kohlenhydraten und Stickstoffverbindungen in den pflanzlichen Leitungsbahnen. *Flora* 147, 1959, 553—593.
- MITTLER, T. E.: Studies on the feeding and nutrition of *Tuberolachnus salignus*. Uptake of phloem sap. *J. exp. Biol.* 34, 1957, 334—341.
- Studies on the feeding and nutrition of *Tuberolachnus salignus*. The nitrogen and sugar composition of ingested phloem sap and excreted honey dew. *J. exp. Biol.* 35, 1958, 74—84.
- MÜNCH, E.: Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Fischer, Jena 1930.
- SWANSON, C. A. und EL SHISHINY, E. D.: Translocation of sugars in the Concord grape. *Pl. Phys.* 33, 1958, 33—37.
- TURNER, E. R.: Movement of organic nitrogen and carbohydrates in *Pelargonium* plants. *Ann. Bot.* 24, 1960, 382—386.
- VERNON, L. P. und ARONOFF, S.: Metabolism of Soybean leaves IV. Translocation from Soybean leaves. *Arch. Biochem.* 36, 1952, 383—398.
- WANNER, H.: Die Zusammensetzung des Siebröhrensaftes. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 63, 1953, 162—168.
- WANNER, H. und BACHOFEN, R.: Transport und Verteilung von markierten Assimilaten I. *Planta* 57, 1961, 531—542.
- WEATHERLEY, P. E., PEEL, A. J. und HILL, G. P.: The physiology of the sieve tube, Preliminary experiments using aphid mouth parts. *J. exp. Bot.* 10, 1959, 1—16.
- ZIEGLER, H.: Untersuchungen über die Leitung und Sekretion der Assimilate. *Planta* 47, 1956, 447—500.
- ZIEGLER, H. und MITTLER, T. E.: Über den Zuckergehalt der Siebröhren- bzw. Siebzellensäfte von *Heracleum Mantegazzianum* und *Picea abies*. *Z. Naturforsch.* 14b, 1959, 278—281.
- ZIMMERMANN, M. H.: Translocation of organic substances in trees. I. The nature of the sugars in the sieve tube exudate. *Pl. Phys.* 32, 1957, 288—291.

