

Über Versuche mit ^{14}C zum Einbau von Karbonat-Kohlenstoff in organische Substanz von Vitis vinifera- Blättern

von

K. KLEMM

Im Zusammenhang mit der Resistenzzüchtung bei der Rebe gegen den „Roten Brenner“ (*Pseudopeziza tracheiphila* Müller-Thurgau) werden auch Untersuchungen über stoffwechselphysiologische Beziehungen zwischen befallenen Blatt und Parasit durchgeführt. So wurde in Versuchen mit künstlich radioaktiven Isotopen isolierten Blättern vor und nach Befall durch *Ps. tracheiphila* ^{14}C in Form einer Lösung von markiertem Na_2CO_3 gegeben. Nach der Aufnahme der Salzlösung durch den Stiel wurde die Verteilung der Aktivität im Blatt in verschiedenen Zeitabständen nach der Infektion durch eine Hyphen-Suspension* untersucht. Über die Befunde, die sich bei einer radiographischen Analyse von Pressaft-Papier-Chromatogrammen und Mazeraten behandelter Blätter über den Verbleib der Aktivität in Inhaltsstoffen ergaben, soll hier kurz berichtet werden. Die Ergebnisse zur phytopathologischen Fragestellung folgen zu gegebener Zeit an gleicher Stelle.

Die zu den Versuchen verwandten Blätter stammten von 7-9 Wochen alten Pfropfreben. Sie wurden bei einer Oberflächengröße von ca. 30 cm^2 unter Wasser abgeschnitten und mit dem Stiel in Glastuben mit der ^{14}C -markierten Na-Bikarbonat-Lösung** eingestellt. Die silikonisierten Glastuben (Silikon-Öl Wacker-Chemie München) hatten Innenmaße von $5 \times 20\text{ mm}$. Die Öffnungen der Glastuben wurden mit einem Vaseline-Ring um den Blattstiel abgedichtet.

Es wurden jeweils $0,2\text{ cm}^3$ der Lösungen mit Aktivitäten von 5 bis $30\ \mu\text{C}$ im Sonnenlicht in durchschnittlich 3,5 Stunden in die eingestellten Blätter aufgenommen. Nach der Lösungsaufnahme wurde jeweils eine Nachspülmenge von $0,2\text{ cm}^3$ aqua quartzdest. in die Glastuben pipettiert um eventuelle Reste der Lösungen aufnehmen zu lassen. Nach Aufnahme dieses Wassers wurden die Blätter entnommen und einzeln weiter verarbeitet.

Die Glastuben wurden zur Feststellung von möglichen Aktivitätsresten mit insgesamt je 4 cm^3 aqua quartzdest. heiß ausgespült, dieses Wasser dann mit Hilfe eines Warmluftventilators von Probeschälchen $3 \times 30\text{ mm}$ verdunstet. Eine Restaktivität konnte weder durch Strahlungsmessung (Rate-Meter FH 57 und Zählrohr FH Z 15 mit $1,17\text{ mg/cm}^2$ Fensterdicke) noch als Schwärzung auf Röntgenfilm (Agfa-Texo-S Röntgen-Film bei 3 mm Distanz von der Bodenfläche des Probeschälchens und 30 Tagen Expositionszeit) nachgewiesen werden.

Damit kann die Aufnahme der Salzlösungen aus den Glastuben in die Blätter als quantitativ angesetzt werden.

*) HAHN, H.: Eine Auslesemethode für die Resistenzzüchtung gegen den Roten Brenner (*Pseudopeziza tracheiphila* Müller-Thurgau). Vitis 1, 32-33 (1957).

**) „Sodium bicarbonate — C 14“, Radiochemical Centre Amersham, Code: CFA.3 (84,8 mg $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3 = 1\text{ mC }^{14}\text{C}$).

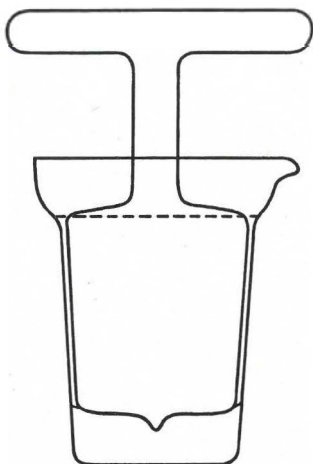


Abb. 1 Hochvacuum-Normschliff 45 flach abgeschmolzen. Das Blatt wird in der Hülse leicht angedrückt, der Kern eingesetzt und in den weiten oberen Glasrand Methanol gegeben. Nach 8 - 10 langsamen und kräftigen Umdrehungen des Schliffes zeigt das mikroskopische Bild nur noch Zellfragmente.

Nach dem Vorliegen der beschriebenen Ergebnisse wurden die Papierchromatogramme mit einem Radio-Papierchromatographen FH 452 unter Verwendung des Zählrohr-Types FH Z 15 mit $1,17 \text{ mg/cm}^2$ Fensterdicke untersucht. ** Zur Auswertung wurden die Schreiberkurven ausgeschnitten und gewogen.

Bei Untersuchung der Papierchromatogramme von 6 verschiedenen Blättern 7 Wochen alter Pfropfreben der Neuzüchtung FS 4-201-39 auf Kober 5 BB ergab sich für Anfang Mai nach Auswertung der Schreiberkurven für die Verteilung der Aktivität auf den Chromatogrammen stets ein Verhältnis von Zuckern zu Säuren wie etwa 3 : 2. Die Verteilung der Chromatogrammaktivitäten

Nach Aufnahme der Salzlösungen und des Nachspülwassers wurden die Blätter getrennt mit je insgesamt 4 cm^3 heißem Methanol in einem Glas-Schliff (s. Abb. 1) zerrieben. Das zerriebene Blattmaterial wurde abzentrifugiert, die festen Rückstände nochmals mit je 4 cm^3 heißem Methanol extrahiert und die Gesamtlösung mit Hilfe eines Warmluftventilators eingeeengt. Anschließend wurde der jeweils eingeeengte Blattextrakt aufsteigend und durchlaufend auf Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043 b M I mit Partridge-Gemisch chromatographiert.

Nach der Trocknung wurden die Papierchromatogramme auf Röntgenfilm Agfa-Texo-S* gepreßt, der Film 10 - 20 Tage exponiert und anschließend mit Agfa-Röntgen-Rapid-Entwickler 10 min. bei 20°C entwickelt.

Zur Identifikation der aktivierten Substanzen liefen in den folgenden Papierchromatogrammen entsprechende Vergleichssubstanzen mit. Besprüht wurden die Papierchromatogramme mit Brom-Phenol-Blau auf organische Säuren, mit Para-Anisidin auf Zucker (UV-Fluoreszenz).

Durch Vergleich der Schwärzungsstellen auf den Röntgenfilm mit den entwickelten Flecken auf den jeweils zugehörigen Papierchromatogrammen konnte eine Aktivität in Apfelsäure, Zitronensäure, Weinsäure, Fructose, Glucose und Glucuronsäure sicher nachgewiesen werden.

Tabelle 1

Verteilung der Chromatogramm-Aktivitäten aus Messungen mit dem Radiopapierchromatographen.*

Glucuronsäure (und nicht identifizierte Substanzen nahezu gleicher R_f -Werte)	$14 \pm 5\%$
Weitere nicht identifizierte Stoffe	$10 \pm 3\%$
Glucose	$28 \pm 4\%$
Fruktose	$18 \pm 4\%$
Weinsäure	$5,5 \pm 2\%$
Zitronensäure	$10 \pm 2\%$
Apfelsäure	$14 \pm 4\%$

*) Prozentangaben bezogen auf die Chromatogramm-Gesamtaktivität nach Auswertung der Schreiberkurven.

*) Die beiderseits begossenen Texo-S-Filme liegen in lichtdichten Hüllen einzeln zwischen 20μ starken Bleifolien, für Chromatogramme mit ^{14}C also in praktisch auch strahlungssicheren „Kassetten“.

**) Den Herren Professoren Dr. LANGENDORFF und Dr. K. PHILIPP danke ich herzlich für die Möglichkeit der Benutzung der entsprechenden Geräte des radiologischen Institutes der Universität Freiburg/Breisgau.

auf die einzelnen identifizierten Substanzen ist aus Tabelle 1 zu entnehmen.

Vergleichsmessungen mit Standardpräparaten zeigten, daß bei einer aufgenommenen Ausgangsaktivität von $15 \mu\text{C}$ aus den Glastuben das ^{14}C aus dem Na-Bicarbonat in einer Größenordnung von $55 \pm 10\%$ in der organischen Blattsubstanz wieder gefunden werden kann.

Eine mögliche Aufnahme von gasförmigen $^{14}\text{CO}_2$ aus eventuellem Zerfall des Bicarbonates in den Aufnahmeplastuben kann ausgeschlossen werden: Kontrollblätter, die in Wasser standen und unter den Versuchsblättern, zwischen deren Blattspitze und der betreffenden Glastube mit markierter Bicarbonat-Lösung über der Öffnung der Glastube lagen, hinterließen auch nach 30 Tagen Expositionszeit keine Schwärzungen auf Texo-S-Film. Es ergab sich auch dann nicht die geringste Schwärzung auf der Photo-Emulsion wenn der Vaseline-Ring zur Abdichtung der Glastuben weggelassen wurde.

Nach dem gesicherten Einbau des Bikarbonat-Kohlenstoffes in die Glucose war auch eine Aktivität in der Cellulose der behandelten Blätter zu erwarten.

Zwei Blätter wurden nach der Aufnahme von je $10 \mu\text{C}$ je 10 min. in 4 %iger Schwefelsäure, dann 20 %iger Kalilauge gekocht, die Reste über einem Schott Glasfilter G 2 gut ausgewaschen und auf vorbehandelte mikroskopische Objektträger gebracht („subbed Glass-slides“ nach Kodak Data-sheet Nr. PL 1151 R 1085). Die Präparate wurden mit einer Schicht Kodak-Stripping-Film, Emulsions-Type AR 10 überdeckt und die Schicht exponiert. Entwickelt wurde 8 - 10 min. bei 18°C mit Kodak D 19 B Entwickler.

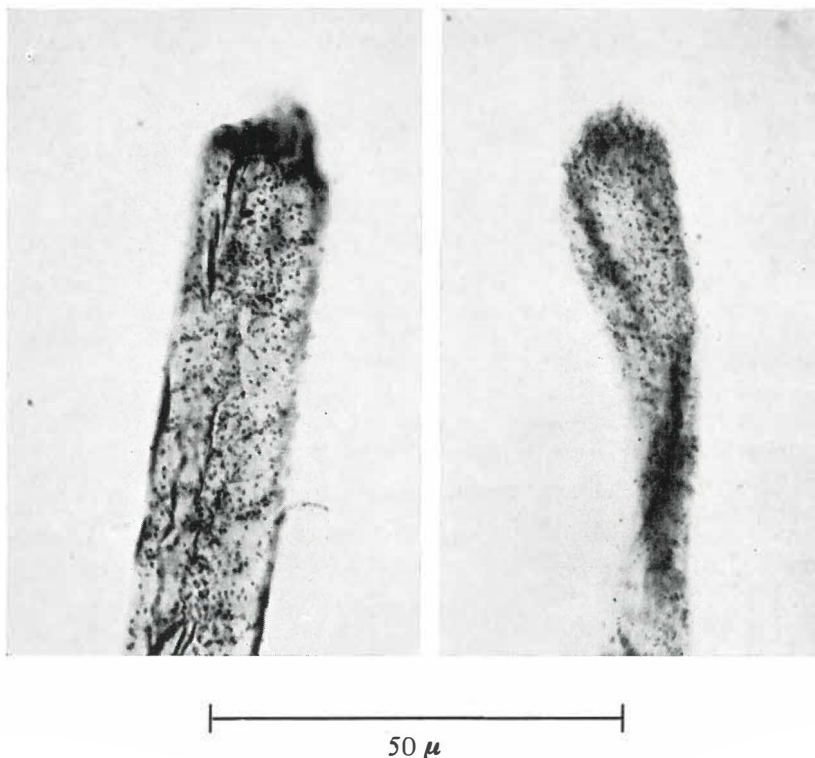


Abb. 2 Schwärzungskörner in der Stripping-Emulsion über Zellen aus maceriertem Blattgewebe (Aufarbeitung siehe Text). Expositionszeit 20 Stunden.

Bereits nach 20 Stunden Exposition zeigten sich bei mikroskopischer Betrachtung über den Celluloseresten eindeutig Schwärzungskörner in stark erhöhter Zahl gegenüber der Hintergrundschwärzung (Abb. 2). Ein Einbau des gebotenen ^{14}C aus dem aufgenommenen Bikarbonat in die Cellulose ist damit gesichert.

Nach den beschriebenen Versuchen ist die Aufnahme der Na-Bikarbonatlösung in das Blatt und der Einbau des Kohlenstoffes aus dem Karbonat in organische Substanzen der Blätter von *Vitis vinifera* gesichert. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß das aufgenommene Bikarbonat am Reaktionsort dissoziiert, d.h. der Karbonat-Kohlenstoff in Form von HCO_3^- -Ionen vorliegt, ist der Einbau dieses Kohlenstoffes in organische Blattsubstanz über den normalen photosynthetischen Cyklus naheliegend. So war ein Einbau von Karbonat-Kohlenstoff auch für die Blätter anderer Pflanzen anzunehmen und in diesbezüglichen Kontroll-Versuchen auch beobachtet worden. — Nach der Feststellung des Karbonat-Kohlenstoffes in der Glucose wurde er auch in der Cellulose erwartet und dann festgestellt.

Über die Verhältnisse bei anderen Pflanzen und die Analyse der bis jetzt zwar noch nicht identifizierten, aber als aktiviert festgestellten Substanzen wird noch zu berichten sein.

Besondere Bedeutung können die beschriebenen Ergebnisse dadurch erhalten, daß durch entsprechende Verbesserung der Methodik und Auswahl des jeweils bestgeeigneten Pflanzenmaterials einfache Laboratoriums-Methoden zur Gewinnung verschiedener markierter Substanzen bei guten Ausnutzungskoeffizienten erarbeitet werden können. Für *Vitis* ist besonders an eine Markierung der Weinsäure zu denken. Arbeiten in dieser Richtung sind begonnen worden.

Nach vorhandenen Versuchsunterlagen aus dem vorangegangenen Spätjahre liegen bei *Vitis* sortenabhängige jahres- und tageszeitliche Verschiebungen in dem erwähnten Säure/Zucker-Verhältnis vor, wobei die Extremwerte mit der Reifezeit der Trauben zusammenfallen*. Eingehende Untersuchungen über diese, anscheinend sortenspezifischen Verschiebungen lassen, besonders wenn in der Reifezeit durchgeführt, wichtige Hinweise für die Auslese resistenter Neuzuchten auf Qualität erwarten.

eingegangen am 31. 7. 1958

*) Nicht veröffentlichte Ergebnisse von Herrn BAYER, Geilweilerhof weisen sehr stark in diese Richtung.