

DER EINFLUSS VON PHYTOCHROM
AUF DIE STATIONÄREN KONZENTRATIONEN
VON ASCORBINSÄURE UND DEHYDROASCORBINSÄURE
BEIM SENFKEIMLING (*SINAPIS ALBA L.*)

PETER SCHOPFER

Botanisches Institut der Universität Freiburg i. Br.

Eingegangen am 10. Februar 1966

THE CONTROL BY PHYTOCHROME OF THE CONTENTS OF ASCORBIC
ACID AND DEHYDROASCORBIC ACID IN THE MUSTARD SEEDLING
(*SINAPIS ALBA L.*)

Summary. A dark grown seedling of white seeded mustard (*Sinapis alba L.*) contains an appreciable amount of ascorbic acid. The content of ascorbic acid, however, will strongly increase under the influence of light. This effect is due to phytochrome. Photosynthesis is not involved under our experimental conditions.

The content of dehydroascorbic acid is always very low compared to ascorbic acid (5—8 % of total ascorbate). Phytochrome does not influence this relation.

The lag-phase of the phytochrome induced increase in ascorbic acid accumulation is remarkably short, about 1 hour after the onset of light compared to about 4 hours for phytochrome induced anthocyanin synthesis under our conditions.

This is the shortest lag-phase we have observed hitherto in the case of "positive" photoresponses (MOHR, 1966).

If we assume that the function of phytochrome in the case of "positive" photoresponses involves a differential gene activation of "potentially active" genes (MOHR, 1966) the following working hypothesis can be advanced: phytochrome induced accumulation of ascorbic acid will lead to a separation of DNA-histone complexes in the range of "potentially active" genes. This makes possible the DNA-dependent synthesis of m-RNAs at those sites which are lastly responsible for the initiation of "positive" photoresponses. — Arguments are briefly considered which support the view that ascorbic acid exerts a function in connection with the regulation of gene activity.

Einleitung

Ascorbinsäure¹ scheint ein essentieller Bestandteil zumindest aller höheren lebendigen Systeme zu sein. Ihr universelles Vorkommen und die Tatsache, daß sie beim Menschen die Rolle eines Vitamins spielt, hat schon seit langem das Interesse der Biologen an dieser Substanz geweckt. Bis heute ist jedoch noch keine umfassende Antwort auf die Frage nach ihrer molekularen Funktion in der lebendigen Zelle möglich. Der AS-Gehalt ist bei den potentiell grünen Pflanzen durch Variation einer Reihe

¹ Die folgenden Abkürzungen werden verwendet: AS = l-Ascorbinsäure, DAS = Dehydro-l-Ascorbinsäure, TA = Totalascorbat (= AS + DAS), P₇₃₀ = dunkelrotabsorbierende Form von Phytochrom, HR = Hellrot, DR = Dunkelrot, DIP = 2,6-Dichlorophenolindophenol.

von Außenbedingungen (z. B. Temperatur, CO_2 -Partialdruck, Nährstoffversorgung) beeinflussbar. Den auffallendsten Effekt hat jedoch der Außenfaktor Licht. Bereits bei REID (1938) findet sich der bezeichnende Satz: "Light has been found to have the most profound effect of any of the environmental factors thus far tested." Diese Tatsache wird durch zahlreiche Befunde belegt (Zusammenfassung bei ISHERWOOD und MAPSON, 1962).

Es ist naheliegend, den Lichteinfluß in einen Zusammenhang mit der Photosynthese zu bringen. Dies ist aber offenbar nur bei solchen Objekten gerechtfertigt, die über keine größeren Stoffwechselreserven verfügen und deshalb bei praktisch allen Synthesen letztlich von der Photosynthese abhängen (vgl. FRANKE, 1959). In den letzten Jahren wurde gezeigt, daß neben der Photosynthese zumindest ein weiteres photochemisches Reaktionssystem existiert, welches den Stoffwechsel und die Morphogenese von potentiell grünen Pflanzen entscheidend beeinflusst (vgl. MOHR, 1965). Dieses reversible Pigmentsystem ist unter dem Namen Phytochrom bekannt. Ein erster Hinweis für seine Wirksamkeit bei der Erhöhung des AS-Gehaltes pflanzlicher Zellen wurde durch RUGE (1957) gegeben, der bei *Tradescantiablättern* fand, daß vor allem dunkelrotes Licht einen stark fördernden Effekt hat.

Der Einfluß des Phytochromsystems auf energieverbrauchende Synthesen kann besonders gut an Objekten studiert werden, bei denen die Photosynthese nicht als limitierender Faktor in Erscheinung tritt. Diese Voraussetzung ist z. B. bei Keimlingen von *Sinapis alba* während der ersten 3 Tage nach der Aussaat gegeben. Daneben bietet der Senfkeimling den großen Vorteil, daß bereits eine Fülle von Daten zur Photomorphogenese vorliegen (vgl. MOHR, 1965, 1966). Dank einer weitgehenden Standardisierung der Anzucht- und Bestrahlungsbedingungen ist es möglich, viele dieser Daten in eine direkte Beziehung miteinander zu bringen. — Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, einen Beitrag zu einer umfassenden Theorie der durch Phytochrom gesteuerten Photomorphogenese, gewonnen am Beispiel des Senfkeimlings, zu liefern.

Material und Methoden

1. Material

Das Samenmaterial von *Sinapis alba* L. (Botan. Garten Freiburg, Ernte 1963) stammt aus der 2. Nachzucht einer seit 1957 von MOHR und Mitarb. verwendeten, relativ homogenen Population.

2. Bestrahlungsanlagen

Es wurden die Standardfelder des Instituts für HR ($\lambda_{\text{max}} = 658 \text{ nm}$, Halbwertsbreite etwa 20 nm , Intensität $750 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec} \pm 10 \%$; vgl. MOHR, MEYER und HARTMANN, 1964) und DR ($\lambda_{\text{max}} = 740 \text{ nm}$, Halbwertsbreite etwa 100 nm , Intensität $3800 \text{ erg/cm}^2 \cdot \text{sec} \pm 10 \%$; vgl. WEIDNER, JAKOBS und MOHR, 1965) verwendet.

3. Ansatz der Versuche

Die im Institut üblichen Standardbedingungen zur Anzucht von Keimlingen (auf Chromatographiepapier mit aqua dest., $25,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$; vgl. MOHR, 1966) wurden strikt eingehalten.

4. Auswertung der Versuche

Von je 25 gemeinsam ausgesäten Keimlingen wurden die 23 größten in Homogenisiergefäßen (vgl. Abb. 1), welche 7 ml Homogenisiergemisch (2 Teile HPO_3 -Lö-

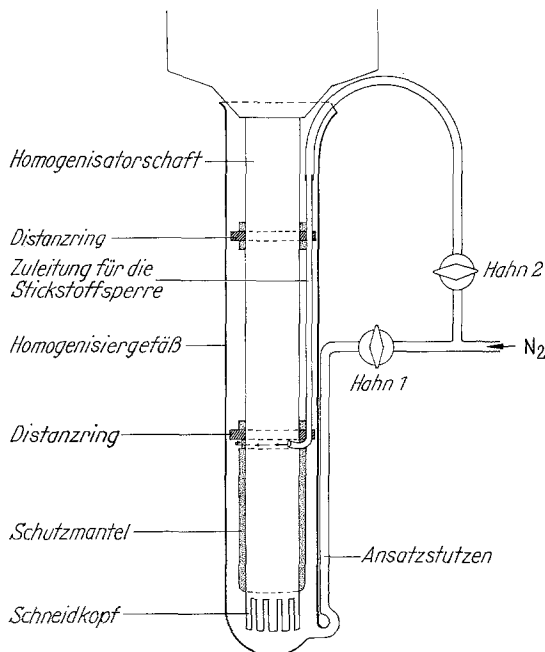


Abb. 1. Apparatur zum Homogenisieren unter Stickstoffbegasung. Der Homogenisatorschaft wird durch 2 Distanzringe im Zentrum des Homogenisiergefäßes gehalten. Der in das Homogenat eintauchende Teil des Schaftes ist mit einem Schutzmantel aus Polyäthylen überzogen, um ein Festkleben von Partikeln zu verhindern. Durch die „Stickstoffsperre“ entsteht ein ringförmiger Gasstrom über dem Homogenat, der das Eindringen von Luft verhindert. Das Homogenisiergefäß wird durch ein Äthanol/Trockeneisbad (-75°C) gekühlt

sung [75 mg/ml],² 3 Teile Methanol) enthalten, bei -75°C eingefroren und mit einem modifizierten „Ultra-Turrax“-Homogenisator (TP 18/2, Janke & Kunkel KG, Staufen i. Br.) unter Kühlung (Äthanol/Trockeneis-Bad) und N_2 -Begasung homogenisiert (vgl. Abb. 1): Nach dem Einführen des Homogenisatorschaftes werden die Proben 2 min mit einem kräftigen N_2 -Strom durch den Ansatzstutzen begast. Dann wird Hahn 1 geschlossen und durch Öffnen von Hahn 2 ein ringförmiger Gasstrom über der Probe erzeugt, welcher das Eindringen von Luftsauerstoff verhindert. Während des Homogenisierens (2 min) steigt die Temperatur der Probe von -75°C auf -20°C an. Anschließend werden 10 ml HPO_3 -Lösung [30 mg/ml] zugegeben und der Homogenisator nochmals kurz eingeschaltet. Nach dem Zentrifugieren

² Alle Lösungen wurden mit aqua bidest hergestellt.

(10 min, $20\,000 \times g$, $0^\circ C$) erhält man einen klaren Extrakt. Bei dieser Art der Aufarbeitung wird eine Oxydation von AS weitgehend vermieden (vgl. BARKER und MAPSON, 1959). Ein vor dem Homogenisieren zugesetzter Standard von AS und DAS wird im Extrakt innerhalb der Fehlergrenzen quantitativ wiedergefunden (Tabelle 1).

Tabelle 1. Wiederfinden eines Gemisches von AS und DAS, das zu Keimlingen vor dem Homogenisieren zugesetzt wurde. Alter der Keimlinge: 72 Std. Die Hellrot-Keimlinge wurden 24 Std im Dunkeln gehalten und dann für 48 Std bestrahlt. Alle Werte sind in der Einheit nMol/Keimling angegeben

	I Standard	II Keimlinge	III Standard + Keimlinge	Vom Standard wiedergefunden (III—II)
<i>A. Dunkelkeimlinge</i>				
TA	55	37 ± 1	93 ± 1	56
AS	35	36 ± 1	70 ± 1	34
DAS	20	1	23	22
<i>B. Hellrot-Keimlinge</i>				
TA	$24 \pm 0,1$	78 ± 3	107 ± 3	29
AS	$22 \pm 0,3$	75 ± 3	101 ± 3	26
DAS	2	3	6	3

5. Analytische Bestimmungen

a) *Ascorbinsäure-Bestimmung.* Im Prinzip wurde nach dem photometrischen Verfahren von BÉSSÉY (1938) verfahren: Mit einem direkt anzeigenden Eppendorf-Photometer (Netheler & Hinz, Hamburg) wird die reduktive Entfärbung von DIP durch AS gemessen (578 nm-Hg-Linie, 4 cm-Cuvetten, Cuvettenhalter auf $20^\circ C$ temperiert). Zur Messung werden 5 ml Citratpuffer [400 mg/ml Citronensäure; 180 mg/ml $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$; pH 2,1] und 3 ml Extrakt in der Cuvette gemischt und 1 ml DIP-Lösung [150 $\mu g/ml$] mit einer kalibrierten Meßspritze rasch zugegeben. Der Cuvetteninhalt (pH 2,3—2,5) wird mit einem Kunststofflöffelchen gut durchmischt. 40 sec (E_{40}) und 80 sec (E_{80}) nach DIP-Zugabe wird der Extinktionswert abgelesen. Anschließend wird mit einer Spur kristalliner AS das DIP vollständig entfärbt und die Extinktion (E_R) abgelesen. Zu jeder Meßserie wird ein Leerwert (ΔE_L) mit Leerextrakt (reines Lösungsmittel) auf dieselbe Weise bestimmt. Die durch den AS-Gehalt der Probe hervorgerufene Entfärbung des DIP entspricht dann der Extinktionsänderung $\Delta E_{AS} = \Delta E_L + E_R + E_{80} - 2 E_{40}$. Durch diese Art der Bestimmung kann die durch Zerstörung des DIP bei niedrigem pH-Wert bedingte, lineare Drift der Extinktion (vgl. Abb. 3) eliminiert werden. Mit Hilfe einer Eichkurve (Abb. 2) wird der AS-Gehalt in der Einheit nMol AS pro Keimling berechnet.

b) *Totalascorbat-Bestimmung.* Nach HUGHES (1956) kann DAS mit einem Überschuß an Homocystein quantitativ zu AS reduziert werden. Die anschließende Bestimmung von AS wird nicht gestört, da bei pH 2,5 die Reduktion von DIP durch Homocystein erst 40—50 sec nach dem Start der Reaktion einsetzt. Zu je 5 ml Extrakt werden 1,7 ml Homocysteinlösung [2 mg/ml]³ zugegeben und mit 1,2 ml $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ -Lösung [500 mg/ml] der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Die Proben bleiben 60—90 min bei Zimmertemperatur stehen. Anschließend wird mit 3 ml

³ Light and Co. Ltd., Colnbrook, England.

dieses Ansatzes wie bei der AS-Bestimmung verfahren. Verursacht vom Homocystein, beobachtet man bei dieser Bestimmung eine andere Extinktionskinetik.

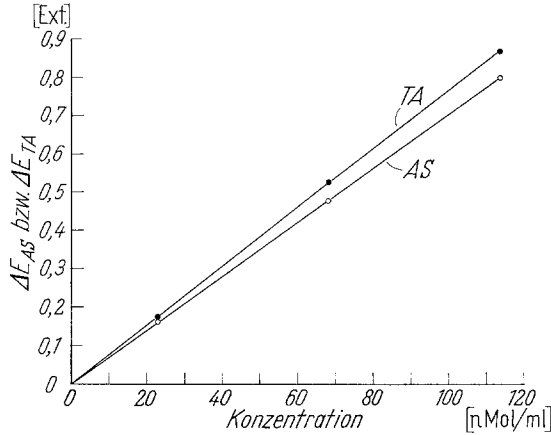


Abb. 2. Eichkurve der Ascorbinsäure-Bestimmung (o—o) und der Totalascorbat-Bestimmung (•—•)

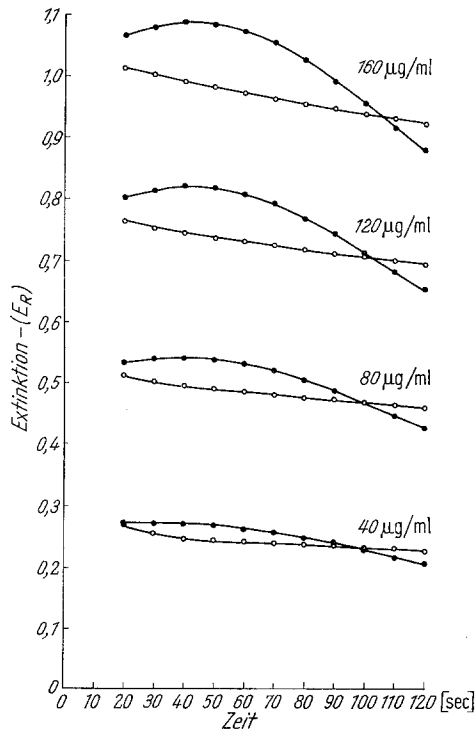


Abb. 3. Änderungen der Extinktion bei der Ascorbinsäure-Bestimmung (o—o) und der Totalascorbat-Bestimmung (•—•) bei verschiedenen Dichlorophenolindophenol-Konzentrationen (160, 120, 80, 40 $\mu\text{g/ml}$)

Der auf DIP-Zerstörung beruhenden Drift ist eine weitere Reaktion überlagert, welche die Extinktion während der ersten 42 sec geringfügig erhöht (Abb. 3)⁴. Anschließend fällt die Extinktion stark ab, da sich die Reduktion des Farbstoffes durch Homocystein bemerkbar macht. Zur Berechnung wird der Gipfelwert (E_{\max}) der Kurve benützt. Er wird bei 20° C Cuvettentemperatur nach 43—44 sec erreicht. Nach Entfärbung des DIP mit einer Spur kristalliner AS wird die Restextinktion (E_R) gemessen. Analog zur AS-Bestimmung wird auch hier mit Leerextrakt ein Leerwert (ΔE_L) bestimmt. Die durch TA hervorgerufene Extinktionsänderung ist dann $\Delta E_{TA} = \Delta E_L + E_R - E_{\max}$. Die auf dieser Basis mit DAS-Standard bestimmte Eichkurve (Abb. 2) ist ebenfalls strikt linear. Sie hat jedoch im Vergleich zur AS-Eichkurve eine etwas größere Steigung. Der Wert für TA ist der gleiche, wenn der Standard AS, DAS oder eine beliebige Mischung beider enthält. Der TA-Gehalt wird in der Einheit nMol TA pro Keimling berechnet. Der DAS-Gehalt ergibt sich durch die Subtraktion des AS-Gehaltes vom TA-Gehalt. Durch Borat kann DAS spezifisch zerstört werden (HUELIN, 1949; HUGHES, 1956). In der Tat verschwindet nach Boratzugabe zum neutralisierten Extrakt die Differenz zwischen TA- und AS-Gehalt vollkommen. Die DAS-Bestimmung kann daher als spezifisch angesehen werden.

c) *Anthocyanbestimmung.* Die Restextinktion des Ansatzes nach der totalen Entfärbung von DIP geht auf die Anwesenheit von Anthocyan im Extrakt zurück. Daher kann bei der AS-Bestimmung die um E_R des Leerwertes korrigierte Restextinktion der Proben als Maß für den relativen Anthocyangehalt verwendet werden. Das Lambert-Beersche Gesetz erweist sich als exakt gültig. Da keine Korrektur für die Streuung durchgeführt wurde, weisen die Dunkelkontrollen relativ hohe Extinktionswerte auf.

d) *Fehlerermittlung.* Für jeden Kurvenpunkt wurden 4—8 unabhängige Analysen von je 23 Keimlingen durchgeführt. Die in manchen Tabellen und Abbildungen angegebenen Fehlerschranken beziehen sich auf die Schätzung des einfachen mittleren Fehlers des arithmetischen Mittels. Sie wurden mit Hilfe der wissenschaftlichen Tabellen, Documenta Geigy (1960) als Bruchteil des mittleren Extrembereiches berechnet. Der methodische Fehler (Aufarbeitung und Analyse) für 4 Proben liegt in der Größenordnung von 1 %.

Ergebnisse

1. Das Verhältnis Ascorbinsäure/Dehydroascorbinsäure

Über das Verhältnis AS/DAS werden in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben gemacht. BARKER und MAPSON (1959) fanden bei verschiedenen pflanzlichen Objekten nur sehr geringe Mengen von DAS (in der Größenordnung von 5 % des TA-Gehaltes), während z. B. SPRAGG und YEMM (1959) bei Erbsenkeimlingen einen recht beträchtlichen DAS-Gehalt gemessen haben (etwa 30 % des TA-Gehaltes). FRANKE (1954, 1957) fand bei Dunkelkeimlingen von *Sinapis alba* sehr hohe DAS-Werte (z. B. für 72 Std alte Keimlinge rund 40 % des TA-Wertes). Diese Angaben konnten nicht bestätigt werden. Abb. 4 zeigt, daß der DAS-Gehalt von

⁴ Bei HUGHES (1956) findet sich kein Hinweis auf die Interaktion zwischen Homocystein und DIP während der ersten 42 sec nach Start der Reaktion. Wahrscheinlich ist die Extinktionszunahme auf die Bildung eines „charge transfer“-Komplexes zwischen den beiden Redoxpartner zurückzuführen.

Sinapis-Keimlingen, welche unter vergleichbaren Bedingungen angezogen wurden, nur etwa 5—8 % des TA-Gehaltes ausmacht. Die hohen DAS-Werte FRANKEs dürften, zumindest partiell, auf einen unzureichenden Oxydationsschutz bei der Aufarbeitung der Keimlinge zurückzuführen sein. Aus der Tabelle 2 wird deutlich, daß das Zerkleinern der Keimlinge in einer Reibschale bei Zimmertemperatur und Luftzutritt zu einer

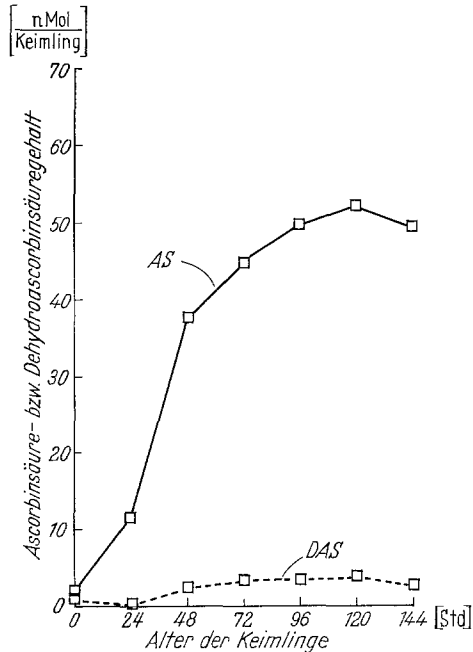


Abb. 4. Die Abhängigkeit des Ascorbinsäuregehaltes (—□) und des Dehydroascorbinsäuregehaltes (---□) vom Alter bei Dunkelkeimlingen

Tabelle 2. Vergleich zweier Aufschlußmethoden. Es wurden jeweils 4mal 23 Dunkelkeimlinge (72 Std alt) 1. nach dem beschriebenen Homogenisierverfahren und 2. mit 1 g Quarzsand und 7 ml Homogenisiergemisch bei Zimmertemperatur für 90 sec in einem Porzellanmörser zerrieben. Alle übrigen Versuchsbedingungen waren gleich

	TA nMol/Keiml.	AS nMol/Keiml.	DAS nMol/Keiml.	% DAS
1. „Ultra-Turrax“-Homogenisator (Kühlung, Luftabschluß)	38,7	36,4	2,3	6
2. Reibschale (Zimmertemperatur, Luftzutritt)	37,8	31,4	6,4	17

beträchtlichen Oxydation von AS führt. Alle Daten, welche ohne Berücksichtigung dieses Sachverhaltes gewonnen wurden, müssen daher, zumin-

dest teilweise, als Artefakte der Aufarbeitung angesehen werden. Es besteht Grund zu der Annahme, daß DAS zumindest in den Keimlingen der höheren Pflanzen nur in geringer Konzentration vorliegt.

Auch die von FRANKE erwähnte Möglichkeit, daß eine gewisse Menge DAS im ruhenden Samen vorliege und während der ersten Keimungsphase abgebaut werde, hat offenbar keine reale Grundlage. Die Daten von Abb. 4 sprechen dafür, daß Ascorbat erst während der Keimung akkumuliert wird. Es ist denkbar, daß das von FRANKE zur Reduktion des DAS verwendete H_2S zusätzlich andere DIP-reduzierende Substanzen erzeugt hat, welche einen höheren DAS-Gehalt vortäuschten (vgl. SPRAGG und YEMM, 1959).

Bei den Dunkelkeimlingen setzen nach 120—144 Std histolytische Effekte ein, so daß eine weitere Analyse nicht mehr sinnvoll ist. Aus den Daten zur O_2 -Aufnahme und zum Fettabbau (HOCK, KÜHNERT und MOHR, 1965) ist zu schließen, daß bereits nach 72—96 Std ein „Hungerstoffwechsel“ einsetzt. Es ist deshalb bemerkenswert, daß der AS-Gehalt der Keimlinge noch bis zur 120. Std weiter gesteigert wird.

2. Der Einfluß von hellroter und dunkelroter Strahlung auf den Ascorbinsäure- und Dehydroascorbinsäuregehalt

In Abb. 5 ist die Wirkung von HR- und DR-Dauerbestrahlung auf 24 Std alte Dunkelkeimlinge dargestellt. Es wird deutlich, daß der AS-pool durch beide Lichtqualitäten stark vergrößert wird, während der DAS-pool praktisch keine Änderung zeigt. Den gleichen Kurvenverlauf wie für AS erhält man im Prinzip auch für die ebenfalls durch Phytochrom gesteuerte Anthocyansynthese. Während in diesen Fällen DR über den untersuchten Zeitraum hinweg stets wirksamer als HR ist, treten bei der O_2 -Aufnahme der Keimlinge kompliziertere Verhältnisse auf. Dort ist durch eine zeitliche Verschiebung der Optimumkurven am Anfang eine scheinbare Hemmung durch HR und DR zu beobachten (HOCK und MOHR, 1964). Das unterschiedliche kinetische Verhalten von AS-Akkumulation und Atmungsgröße spricht dafür, daß kein direkter Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern besteht.

3. Die Steuerung der Ascorbinsäureakkumulation durch Phytochrom

Die Energie-Effekt-Kurven für HR und DR (Abb. 6) zeigen das für eine Phytochromsteuerung typische Verhalten: Die Erhöhung der AS-Konzentration kann durch kurze HR-Stöße induziert werden. So haben bereits 2mal 15 sec HR eine Vergrößerung des AS-pools um 25 % des Dunkelwertes zur Folge. Die Wirksamkeit von DR nimmt erst nach längerer Bestrahlung stark zu. Diese „Hochenergiereaktion“ ist nach HARTMANN (1966) ebenfalls auf die Funktion des Phytochroms zurückzuführen.

Ein eindeutiger Beweis für den steuernden Einfluß des Phytochroms ist durch den Nachweis der Revertierbarkeit des HR-Effektes durch nachfolgendes DR möglich. Die Energie-Effekt-Kurve der Revertierung

ist in Abb. 7 dargestellt. Man erkennt eine gute Übereinstimmung zwischen den Kurven der DR-Wirkung und der Revertierung. Dies ist auf Grund der Theorie des Phytochroms zu erwarten.

4. Die Beteiligung der Photosynthese am Hellrot-Effekt

Von vielen Autoren wird der Lichteinfluß auf die AS-Konzentration in grünen Pflanzen in einen Zusammenhang mit der Photosynthese

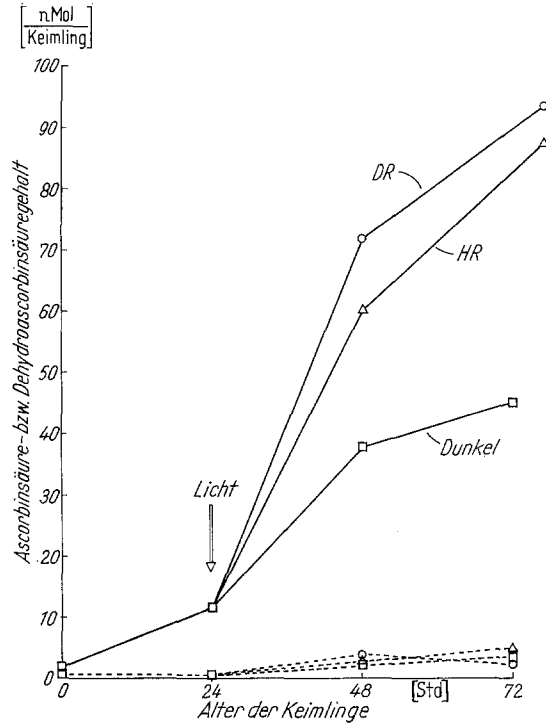


Abb. 5. Die Wirkung von hellroter und dunkelroter Dauerbestrahlung auf den Gehalt an Ascorbinsäure (—) und Dehydroascorbinsäure (-----). Die Keimlinge wurden nach 24 Std Dunkelkeimung mit Hellrot (-△-) bzw. Dunkelrot (-○-) bestrahlt. Dunkelkontrolle: -□-

gebracht (z. B. BUKATSCH, 1940/41; MAPSON, 1962, 1964; MAPSON und SWAIN, 1964). Bei DR-bestrahlten Keimlingen kann, zumindest bei einer Bestrahlungszeit von weniger als 12 Std, die Photosynthese genauso wie bei etiolierten Keimlingen unberücksichtigt bleiben, da praktisch kein Chlorophyll gebildet wird und sicher kein funktionstüchtiger Photosyntheseapparat vorhanden ist (BERTSCH und MOHR, 1965). Dagegen findet bei HR-Bestrahlung eine deutliche Chlorophyllsynthese statt, und damit ist die Möglichkeit einer Beeinflussung des AS-Gehaltes durch Licht über die Photosynthese gegeben.

Falls die Photosynthese an der Erhöhung des AS-pools durch HR beteiligt ist, müßte ihre Wirksamkeit bei Dauerbestrahlung am stärksten in Erscheinung treten. Dagegen dürfte ihre Wirksamkeit bei einer Serie kurzer Lichtstöße, die über den gleichen Zeitraum verteilt werden, zu vernachlässigen sein. Das Phytochromsystem kann hingegen durch ein HR-, „Stoßprogramm“ ähnlich beeinflußt werden wie durch Dauerlicht.

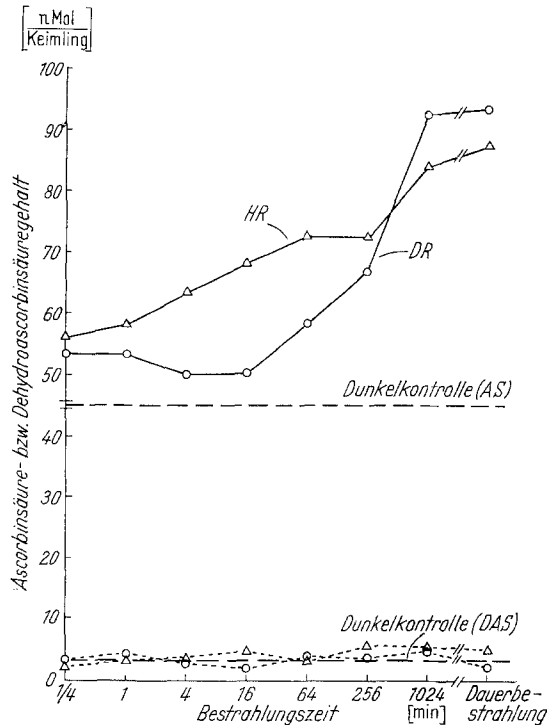


Abb. 6. Energie-Effekt-Kurven des Ascorbinsäuregehaltes (—) und des Dehydroascorbinsäuregehaltes (-----) für Hellrot (—Δ—) und Dunkelrot (—○—), Bestrahlung 24 und 48 Std nach Aussaat, Auswertung 72 Std nach Aussaat

Auf diese Weise ist es möglich, den Einfluß der beiden Systeme experimentell zu trennen und quantitativ abzuschätzen.

In Abb. 8 ist das Ergebnis dieses Vergleichs dargestellt. Bei AS können durch 16 kurze HR-Stöße 66 % der Wirkung von 48 Std Dauerbestrahlung erzielt werden. Wird die Zahl der Lichtstöße auf die Hälfte reduziert, tritt nur eine geringfügige Verminderung der Wirkung ein. Ganz ähnliche Verhältnisse ergeben sich auch für die Synthese von Anthocyan. Hier sind 59 % der Dauerlichtwirkung durch das Stoßprogramm ersetzbar.

Diese Ergebnisse zeigen, daß auch im HR die Photosynthese nicht zur Deutung der beobachteten Phänomene herangezogen werden kann. Selbst bei einer Bestrahlung von 48 Std ist höchstens ein Drittel der Lichtwirkung, wahrscheinlich jedoch wesentlich weniger, auf eine Beteiligung der Photosynthese zurückzuführen.

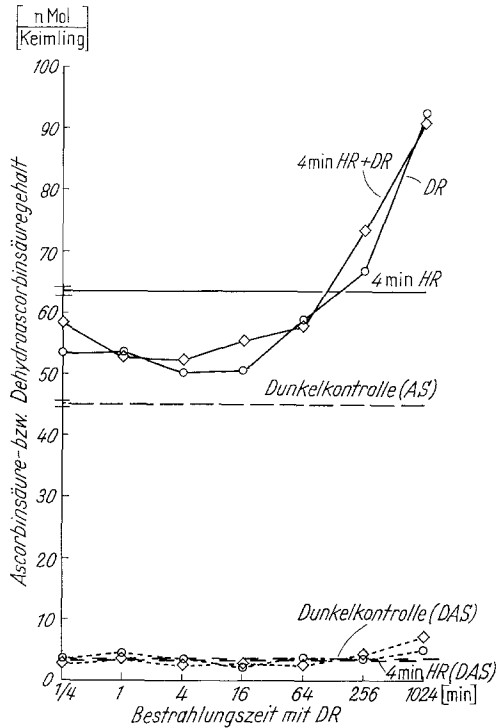


Abb. 7. Energie-Effekt-Kurve der Revertierung einer mit 4 min Hellrot durchgeführten Induktion der Ascorbinsäureakkumulation durch unmittelbar nachfolgende Dunkelrotbestrahlung. Bestrahlung 24 und 48 Std nach Aussaat, Auswertung 72 Std nach Aussaat. (— Ascorbinsäure, ---- Dehydroascorbinsäure, -o- Dunkelrot allein, -◇- 4 min Hellrot + Dunkelrot)

5. Die Kinetik der Ascorbinsäureakkumulation im Dunkelrot-Dauerlicht

Zur Aufklärung des Kausalablaufes der Photomorphogenese kann die Kenntnis der Zeitabhängigkeit der verschiedenen durch Licht induzierten Reaktionen des Senfkeimlings einen wesentlichen Beitrag liefern. Man kann nämlich erwarten, daß sich die kausale Abfolge der Einzelschritte bei der Photomorphogenese in einer zeitlichen Abfolge der beteiligten Reaktionen manifestiert. Für derartige Untersuchungen ist dunkelrotes Licht besonders geeignet, da es eine zwar niedrige, aber über die ganze Zeit hinweg praktisch konstante Konzentration an P_{730} einstellt (vgl. HARTMANN, 1966). In Abb. 9 ist die Kinetik der phytochrominduzierten

AS-Akkumulation dargestellt. Sie zeigt, daß die Vergrößerung des AS-pools spätestens 1—2 Std nach Lichtbeginn einsetzt. Dieser Befund ist im Zusammenhang mit den Kinetiken anderer phytochromabhängiger Reaktionen des Senfkeimlings von entscheidender Bedeutung.

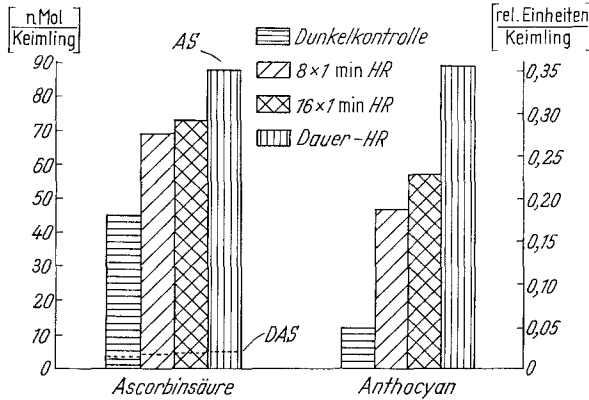


Abb. 8. Der Einfluß eines Hellrot-Stoßprogrammes auf die Konzentrationen von Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure und Anthocyan. Die Bestrahlung erfolgte in regelmäßigen Abständen zwischen 24 und 72 Std nach Aussaat, die Auswertung erfolgte anschließend

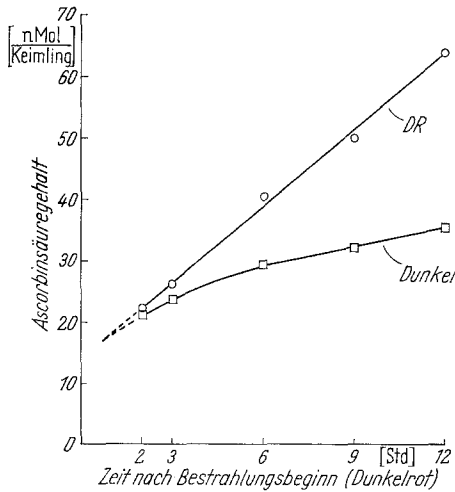


Abb. 9. Die Änderung des Ascorbinsäuregehaltes nach dem Einsetzen der Bestrahlung mit Dunkelrot. Alter der Keimlinge bei Bestrahlungsbeginn: 36 Std (o—o Dunkelrot, □—□ Dunkelkontrolle)

Diskussion

Aus den beschriebenen Experimenten geht klar hervor, daß beim Senfkeimling die lichtabhängige AS-Akkumulation durch Phytochrom veranlaßt wird. Eine der Fragen, die sich im Anschluß an diesen Befund unmittelbar stellen, lautet: Welche Bedeutung hat die durch Phytochrom

induzierte Anhäufung von AS für die Pflanze? Es soll im folgenden versucht werden, auf diese Frage eine Antwort zu finden.

Von verschiedenen Forschern wurden bereits Beiträge zum Verständnis der physiologischen Funktion von AS geliefert. Zum Beispiel hat in neuerer Zeit MAPSON (1962, 1964) mit Hilfe von Kurzzeitexperimenten die schon früher geäußerte Ansicht bekräftigt, daß das AS/DAS-Redoxsystem eine Rolle beim Mechanismus

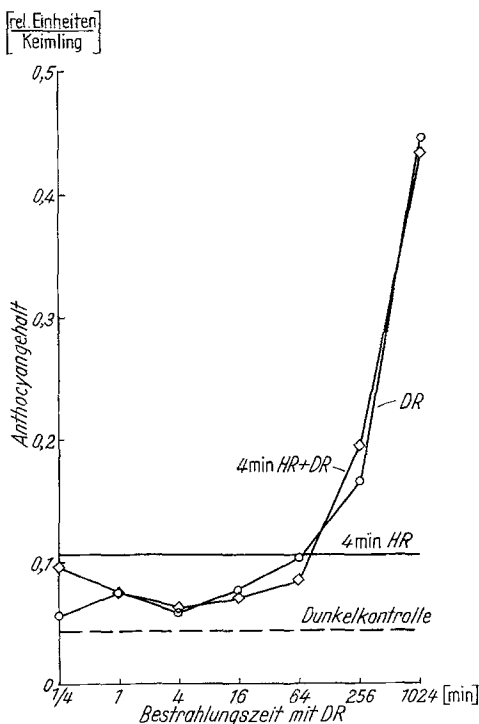


Abb. 10. Energie-Effekt-Kurve der Revertierung einer mit 4 min Hellrot durchgeführten Induktion der Anthocyaninsynthese durch unmittelbar nachfolgende Dunkelrotbestrahlung. Bestrahlung 24 und 48 Std nach Aussaat, Auswertung 72 Std nach Aussaat. (o—o) Dunkelrot allein, ◇—◇ 4 min Hellrot + Dunkelrot)

der Photosynthese spielt. Es unterliegt hier offenbar einer direkten Kontrolle durch Phytochrom (MAPSON und SWAIN, 1964). Für die in der vorliegenden Arbeit angeführten Experimente zur langfristigen Veränderung des AS-pools kann jedoch der Photosyntheseparat außer Betracht bleiben.

Auch mit dem Energiestoffwechsel der Keimlinge kann die AS nicht in Beziehung gebracht werden. Einmal sind Atmungssteigerung (vgl. HOCK und MOHR, 1964) und AS-Akkumulation unter dem Einfluß von Phytochrom nicht miteinander korreliert, und zum anderen spricht der Befund, daß der AS-Gehalt der Dunkelkeimlinge praktisch bis zum Absterben, das durch Erschöpfung der Reservestoffe eintritt, auf seinem einmal erreichten Niveau erhalten bleibt, gegen einen derartigen Zusammenhang (vgl. Abb. 4).

Auffällig ist dagegen die große Ähnlichkeit zwischen der AS-Akkumulation und der ebenfalls durch Phytochrom gesteuerten Anthocyan synthese, welche als typische „positive“ Photomorphose (vgl. MOHR, 1966) gelten kann. Vergleicht man die Abbildungen 7 und 10, so wird die gute Übereinstimmung im Reaktionsverlauf deutlich (vgl. auch Abb. 8). In

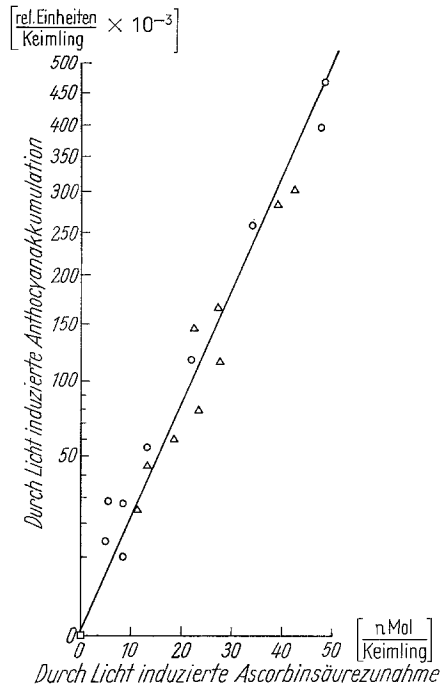


Abb. 11. Die Korrelation zwischen Anthocyan synthese und Ascorbinsäurezunahme unter dem Einfluß von Phytochrom. Ordinate quadratisch transformiert. Die Daten stammen aus den Experimenten der Abb. 5 und 6. (○ Dunkelrot, △ Hellrot, □ Dunkelkontrolle)

Abb. 11 ist die Korrelation der Anthocyan-Daten und der AS-Daten für einige der durchgeführten Experimente dargestellt. Bei quadratischer Stauchung der Ordinate ergibt sich eine lineare Abhängigkeit, d.h. das Ausmaß der Anthocyan synthese steigt quadratisch mit der phytochrom-induzierten AS-Akkumulation an.

Diese Befunde legen es nahe, die Erhöhung des AS-pools in eine Beziehung zum Kausalablauf der Photomorphogenese zu bringen. — Von MOHR wurde in diesem Zusammenhang die Hypothese der differentiellen Genaktivierung zur Beschreibung der Wirkungsweise von Phytochrom herangezogen (НОСК und MOHR, 1964; MOHR, 1966). Danach soll P_{730} mittels einer „Signalkette“ die Aktivierung „potentiell aktiver“ Gene bewirken, welche ihrerseits als Informationsträger für die verschiedenen Photomorphosen ihre Information im Rahmen des Gen \rightarrow m-RNS \rightarrow Enzym-

Modells realisieren. Die Bildung von P_{730} , welche sehr wahrscheinlich in jeder Zelle des Keimlings in genau derselben Weise abläuft (FURUYA und HILLMAN, 1964), hat also nur eine auslösende Funktion, die Spezifität der verschiedenen Photomorphosen ist bereits vorher im Rahmen einer „primären Differenzierung“ im Genom festgelegt. Diese „primäre Differenzierung“ legt fest, welcher Anteil des Genoms in den verschiedenen Zelltypen des Keimlings gerade „potentiell aktiv“ ist. In der Tat

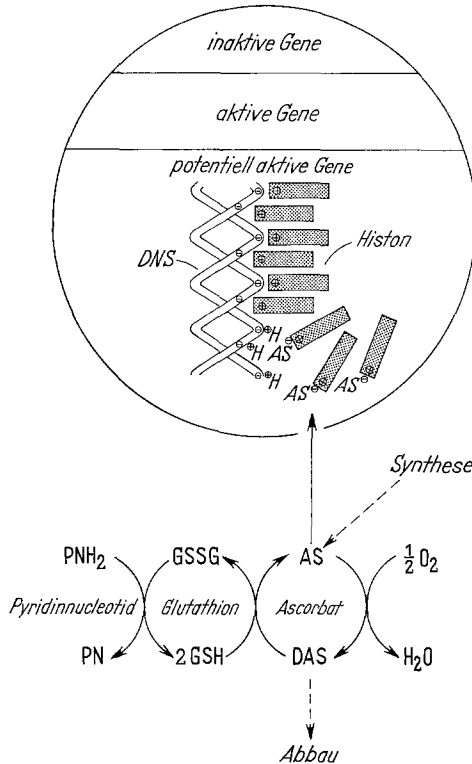
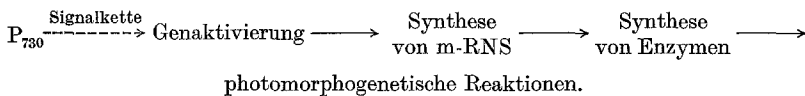


Abb. 12. Ein Modell zum molekularen Mechanismus der De-Reprimierung von „potentiell aktiven“ Genen durch Ascorbinsäure (vgl. Text)

kann man ja bei der Photomorphogenese je nach Zelltyp ganz unterschiedliche Reaktionen auf die Bildung von P_{730} hin beobachten. Diese Hypothese erfährt eine gute Stütze durch den Befund, daß durch passende Konzentrationen von Actinomycin D, welches als spezifischer Hemmstoff der DNS-abhängigen RNS-Synthese bekannt ist, gewisse Photomorphosen annulliert werden können (z.B. LANGE und MOHR, 1965; MOHR, SCHLICKWEI und LANGE, 1965). — Im Prinzip müßte die Auslösung der Photomorphogenese durch folgende Schritte gekennzeichnet sein:



Es stellt sich nun die Frage, an welcher Stelle dieser Sequenz die AS-Akkumulation einzuordnen ist.

Im folgenden soll die Auffassung begründet werden, daß die Funktion der AS im Bereich der „Signalkette“ zu suchen ist. Die AS-Akkumulation würde danach in Beziehung zur Aktivierung (= De-Reprimierung) von Genen stehen. Eine Arbeitshypothese über den molekularen Mechanismus sei hier kurz skizziert (Abb. 12): Eine Erhöhung der AS-Konzentration in der unmittelbaren Umgebung der Gene führt zu einer Spaltung bestimmter DNS-Histon-Komplexe, indem die AS-Anionen das Polyanion DNS von den positiven Ladungsstellen der Histone verdrängen. An den de-reprimierten Genen kann nun die Synthese von m-RNS einsetzen, welche schließlich zur photomorphogenetischen Reaktion des Keimlings führt. Man kann sich vorstellen, daß die Konzentration an AS über eine Redoxkette ähnlich der „Ascorbatatmungskette“ (vgl. BEEVERS, 1961) reguliert wird. Die dafür notwendigen Enzyme konnten in vielen Pflanzen nachgewiesen werden. Dadurch wäre es möglich, die AS-Konzentration in einem dynamischen System von Fließgleichgewichten zu steuern. — Man muß sich darüber im klaren sein, daß dieses Modell das Phänomen der Genaktivierung nur teilweise beschreibt; es bleibt z. B. offen, wie die *spezifische* Aktivierung bestimmter Gene zustande kommt.

Die Hypothese erfährt eine Stütze durch die Befunde von PRICE (1964), der zeigen konnte, daß bei isolierten Kernen aus Weizenembryonen eine Beeinflussung der Genaktivität durch AS möglich ist. Bei Inkubation der Kerne in einem passenden Medium hat AS-Zugabe eine starke Neusynthese von RNS zur Folge (Erhöhung um 50 %). Dagegen wird der DNS-Gehalt der Kerne nicht verändert. Die neusynthetisierte RNS wird ins Medium abgeschieden und besitzt die Eigenschaften der m-RNS (z. B. kann in einem in vitro-System eine Proteinsynthese induziert werden). Neben der m-RNS wird etwa 40 % des basischen Proteins der Kerne ins Medium abgeschieden. Die Fähigkeit der Kerne zur RNS-Synthese wird dadurch nicht verändert. Daß in diesem System DAS ähnlich wie AS wirkt, dürfte darauf beruhen, daß in den Kernen noch ausreichend Reduktionspotential vorhanden ist, um DAS zu AS zu reduzieren.

Für die vorgetragene Hypothese spricht die relativ rasche Änderung des AS-pools nach Einsetzen von DR-Bestrahlung (Abb. 9). Die hier gemessene lag-Phase von etwa 1 Std ist die kürzeste von allen phytochromabhängigen positiven Reaktionen, welche bisher beim Senfkeimling unter vergleichbaren Bedingungen untersucht wurden (z. B. beträgt die lag-Phase der Anthocyansynthese 4—5 Std; vgl. MOHR, 1966). — Weiterhin kann die Hypothese mit Hilfe von Actinomycin D auf ihre Brauchbarkeit hin überprüft werden. Wenn AS an der Steuerung der Genaktivität beteiligt ist, müßte man nämlich erwarten, daß der Phytochromeinfluß auf den AS-pool durch Actinomycin D nicht beeinträchtigt wird. Tatsächlich ist die AS-Akkumulation in dunkelrot bestrahlten Keimlingen, denen Actinomycin in einer Konzentration appliziert wurde, welche z. B. die Anthocyansynthese zu 90 % hemmt (10 µg/ml), praktisch genauso

groß wie in den Kontrollkeimlingen ohne Actinomycin (SCHOPFER, in Vorbereitung).

Wahrscheinlich ließen sich diese experimentellen Daten auch anders deuten. Die hier vorgetragene Hypothese — Ascorbinsäure als Endglied der „Signalkette“ — scheint jedoch geeignet, Anregung zu geben für eine große Zahl von Experimenten.

Nimmt man an, daß die AS generell an der Aktivierung von Genen beteiligt ist, läßt sich eine große Zahl experimenteller Befunde zum Stoffwechsel der AS in höheren Pflanzen deuten. Einige Beispiele seien hierfür angeführt:

a) Eine Fülle von Daten zeigen, daß Gewebe mit besonders hoher Zellaktivität (Wachstumszonen, verletzte Gewebe usw.) einen stark erhöhten AS-Gehalt (z. B. GLÜCK, 1937; REID, 1937, 1941; FRANKE, 1954; JENSEN und KAVALJIAN, 1956), eine erhöhte AS-Oxydaseaktivität (NEWCOMB, 1951; MERTZ, 1961, 1964) und eine erhöhte DAS-Reductaseaktivität (YAMAGUCHI und JOSLYN, 1951; CARTER und PACE, 1964) aufweisen. — Auch die starke Zunahme des AS-Gehaltes und der verschiedenen Enzyme der AS-Redoxkette in keimenden Samen scheint ein allgemeines Phänomen zu sein (CHATTOPADHYAY und BANERJEE, 1952; MAPSON und MOUSTAFA, 1956; MAYER, 1958).

b) Die Umsteuerung von der vegetativen zur reproduktiven Phase im Vegetationspunkt ist mit einer Erhöhung der AS-Konzentration verbunden (CHINYO und Mitarb., 1957).

c) Die wachstumsfördernde Wirkung von Auxinen ist mit einem Anstieg des AS-Gehaltes der betreffenden Organe korreliert (TONZIG und MARRÉ, 1961; KEY, 1962). Es gibt gute Gründe für die Annahme, daß Auxine über eine Genaktivierung wirksam werden (z. B. NOODÉN und THIMANN, 1963; KEY und SHANNON, 1964). — Ganz allgemein scheint eine Erhöhung der AS-Konzentration bzw. der Aktivität relevanter Enzyme bei solchen Phänomenen eine Rolle zu spielen, welche auch im Zusammenhang mit einer Erhöhung der Genaktivität diskutiert werden.

Zusammenfassung

Der Senfkeimling (*Sinapis alba* L.) synthetisiert auch im Dunkeln beträchtliche Mengen an Ascorbinsäure. Durch Licht kann der Ascorbinsäure-Gehalt der Keimlinge stark erhöht werden. Dieser Lichteinfluß ist auf die Funktion von Phytochrom zurückzuführen. Die Photosynthese hat keinen wesentlichen Anteil an der Lichtwirkung. Die Konzentration an Dehydroascorbinsäure ist im Verhältnis zur Ascorbinsäurekonzentration stets sehr gering (5—8 % der Konzentration an Totalascorbat) und wird vom Phytochrom nicht beeinflusst.

Wenn die Funktion von Phytochrom bei den „positiven“ Photomorphosen unter dem Aspekt der differentiellen Genaktivierung (vgl. MOHR, 1966) betrachtet wird, kann die folgende Arbeitshypothese aufgestellt werden: Die durch Phytochrom 730 induzierte Ascorbinsäureakkumulation führt im Bereich von „potentiell aktiven“ Genen zu einer Spaltung gewisser DNS-Histon-Komplexe. Dadurch wird die Synthese von m-RNS an diesen Genen ermöglicht, was schließlich zur Ausbildung der „posi-

tiven“ Photomorphosen führt. Die Argumente, welche zur Zeit für eine Funktion der Ascorbinsäure bei der Regulation der Genaktivität sprechen, werden kurz diskutiert.

Herrn Prof. Dr. H. MOHR bin ich für die Durchsicht des Manuskripts und für materielle und gedankliche Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet. Sie wurde durch Sachbeihilfen der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Stiftung Volkswagenwerk (an Prof. MOHR) ermöglicht.

Literatur

- BARKER, J., and L. W. MAPSON: The ascorbic acid system in plant tissues. I. Influence of various methods of extraction in the estimation of dehydroascorbic acid. *New Phytologist* **58**, 58—67 (1959).
- BEEVERS, H.: *Respiratory metabolism in plants*. Evanston (N. Y.): Row Peterson & Co. 1961.
- BERTSCH, W., u. H. MOHR: Die Unabhängigkeit der lichtinduzierten Anthocyan-synthese von der Photosynthese. *Planta* (Berl.) **65**, 17—26 (1965).
- BESSEY, O. A.: A method for the determination of small quantities of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in turbid and colored solutions in the presence of other reducing substances. *J. biol. Chem.* **126**, 771—784 (1938).
- BUKATSCH, F.: Über die Rolle der Ascorbinsäure in den Chloroplasten. II. Mitt. *Planta* (Berl.) **31**, 209—221 (1940/41).
- CARTER, J. E., and J. PACE: Distribution of dehydroascorbic acid reductase in the wheat grain. *Nature* (Lond.) **201**, 503 (1964).
- CHATTOPADHYAY, H., and S. BANERJEE: Studies on the ascorbic-acid oxidase activity of some common indian pulses during germination. *Indian J. med. Res.* **40**, 439—442 (1952).
- CHINYOY, J. J., K. K. NANDA, and O. P. GARG: Effect of ascorbic acid on growth and flowering of *Trigonella foenum-graecum* and *Brassica chinensis*. *Physiol. Plantarum* (Kbh.) **10**, 869—876 (1957).
- Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Aufl. Basel: J. R. Geigy AG 1960.
- FRANKE, W.: Über die Biosynthese des Vitamins C. I. Mitt. Die Beziehungen zwischen Vitamin C und der Atmung. *Planta* (Berl.) **44**, 437—458 (1954).
- Der Vitamin C-Gehalt von Pflanzen in Abhängigkeit von der Temperatur und das Verhältnis Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure unter besonderer Berücksichtigung gelagerter Kartoffeln. *Planta* (Berl.) **49**, 345—388 (1957).
- Über die Biosynthese des Vitamins C. III. Mitt. Nachweis der Unabhängigkeit der Vitamin-C-Bildung von der Photosynthese. (Bei *Vicia faba minor*) *Planta* (Berl.) **53**, 551—564 (1959).
- FURUYA, M., and W. S. HILLMAN: Observations on spectrophotometrically assayable phytochrome in vivo in etiolated pisum seedlings. *Planta* (Berl.) **63**, 31—42 (1964).
- GLICK, D.: Die quantitative Verteilung der Ascorbinsäure im wachsenden Gerstenembryo. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **245**, 211—215 (1937).
- HARTMANN, K. M.: A general hypothesis to interpret high energy phenomena of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. *Photochem. and Photobiol.* **5**, (1966) (im Druck).
- HOCK, B., E. KÜHNERT u. H. MOHR: Die Regulation von Fettabbau und Atmung bei Senfkeimlingen durch Licht (*Sinapis alba L.*). *Planta* (Berl.) **65**, 129—138 (1965).
- , u. H. MOHR: Die Regulation der O₂-Aufnahme von Senfkeimlingen (*Sinapis alba L.*) durch Licht. *Planta* (Berl.) **61**, 209—228 (1964).

- HUELIN, F. E.: Investigations on the stability and determination of dehydroascorbic acid. *Austral. J. sci. Res. B* **2**, 346—354 (1949).
- HUGHES, R. E.: The use of homocysteine in the estimation of dehydroascorbic acid. *Biochem. J.* **64**, 203—208 (1956).
- ISHERWOOD, F. A., and L. W. MAPSON: Ascorbic acid metabolism in plants: Part II. Biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **13**, 329—350 (1962).
- JENSEN, W. A., and L. G. KAVALJIAN: The cytochemical localization of ascorbic acid in root tip cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* **2**, 87—92 (1956).
- KEY, J. L., and J. C. SHANNON: Enhancement by auxin of ribonucleic acid synthesis in excised soybean hypocotyl tissue. *Plant Physiol.* **39**, 360—364 (1964).
- LANGE, H., u. H. MOHR: Die Hemmung der Phytochrom-induzierten Anthocyan-synthese durch Actinomycin D und Puromycin. *Planta (Berl.)* **67**, 107—121 (1965).
- MAPSON, L. W.: The role of dehydro-l-ascorbic acid as respiratory carrier in plants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **92**, 21—35 (1961).
- Photo-oxidation of ascorbic acid in leaves. *Biochem. J.* **85**, 360—369 (1962).
- The ascorbic acid system in leaves: Further observations on photooxidation and photoreduction. *Phytochemistry* **3**, 429—445 (1964).
- , and E. M. MOUSTAFA: Ascorbic acid and glutathione as respiratory carriers in the respiration of pea seedlings. *Biochem. J.* **62**, 248—259 (1956).
- , and T. SWAIN: Influence of red and far-red light on the photooxidation of ascorbic acid and photoreduction of its oxidized forms. *Nature (Lond.)* **204**, 886—887 (1964).
- MAYER, A. M.: Ascorbic acid oxidase in germinating lettuce seeds and its inhibition. *Physiol. Plantarum (Kbh.)* **11**, 75—83 (1958).
- MERTZ, D.: Distribution and cellular localization of ascorbic acid oxidase in the maize root tip. *Amer. J. Bot.* **48**, 405—413 (1961).
- Ascorbic acid oxidase in cell growth. *Plant Physiol.* **39**, 398—401 (1964).
- MOHR, H.: Steuerung der pflanzlichen Entwicklung durch Licht. *Naturwiss. Rdsch.* **18**, 101—108 (1965).
- Untersuchungen zur phytochrominduzierten Photomorphogenese des Senfkeimlings (*Sinapis alba* L.). *Z. Pflanzenphysiol.* **54**, 63—83 (1966).
- U. MEYER u. K. HARTMANN: Die Beeinflussung der Farnsporen-Keimung [*Osmunda cinnamomea* (L.) und *O. claytoniana* (L.)] über das Phytochromsystem und die Photosynthese. *Planta (Berl.)* **60**, 483—496 (1964).
- I. SCHLICKWEI u. H. LANGE: Die Hemmung des Phytochrom-induzierten Kotyledonenwachstums durch Actinomycin D. *Z. Naturforsch.* **20** b, 819—821 (1965).
- NEWCOMB, E. H.: Effect of auxin on ascorbic oxidase activity in tobacco pith cells. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **76**, 504—509 (1951).
- NOODÉN, L. D., and K. V. THIMANN: Evidence for a requirement for protein synthesis for auxin-induced cell enlargement. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **50**, 194—200 (1963).
- PRICE, C. E.: Nucleic acid synthesis by isolated nuclei. Referat, Tenth Internat. Botanical Congr. Edinburgh 1964.
- REID, M. E.: Localization of ascorbic acid in the cowpea plant at different periods of development. *Amer. J. Bot.* **24**, 445—447 (1937).
- The effect of light on the accumulation of ascorbic acid in young cowpea plants. *Amer. J. Bot.* **25**, 701—711 (1938).
- Relation of vitamin C to cell size in the growing region of the primary root of cowpea seedlings. *Amer. J. Bot.* **28**, 410—415 (1941).

- RUGE, U.: Der Ascorbinsäuregehalt von *Tradescantia*-Blättern in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichtes. *Naturwissenschaften* **44**, 13—14 (1957).
- SPRAGG, S. P., and E. W. YEMM: Respiratory mechanisms and the changes of glutathione and ascorbic acid in germinating peas. *J. exp. Bot.* **10**, 409—425 (1959).
- TONZIG, S., and E. MARRÊ: Ascorbic acid as a growth hormone. In: Fourth Internat. Conf. on Plant Growth Regulation, p. 725—734. Ames: University Press Iowa State 1961.
- WEIDNER, M., M. JAKOBS u. H. MOHR: Über den Einfluß des Phytochroms auf den Gehalt an Ribonucleinsäure und Protein in Senfkeimlingen (*Sinapis alba* L.). *Z. Naturforsch.* **20 b**, 689—693 (1965).
- YAMAGUCHI, M., and M. A. JOSLYN: Investigations of ascorbic acid dehydrogenase of peas (*Pisum sativum*) and its distribution in the developing plant. *Plant Physiol.* **26**, 757—772 (1951).

Dipl.-Biol. PETER SCHOFFER
Botanisches Institut der Universität
78 Freiburg i. Br., Schänzlestraße 9/11