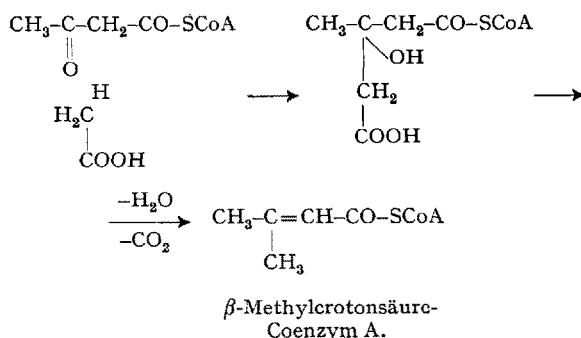


standteile des Coenzym A darstellen, haben diese Vermutung bestätigt. Aus diesen Ergebnissen dürfen wir somit auf eine besondere Bedeutung der Essigsäure bzw. des Acetyl-Coenzym A bei der Biosynthese der Carotinoide schliessen.

In diesem Zusammenhang ist es auch von Interesse, in welcher Weise die C-Atome der vom Mikroorganismus zur Verfügung gestellten Essigsäure in das Molekül des β -Carotins eingebaut werden. Zu diesem Zwecke haben wir das in der Nährlösung befindliche Acetat mit $^{14}\text{CH}_3\cdot\text{COONa}$ bzw. mit $\text{CH}_3\cdot^{14}\text{COONa}$ markiert und aus dem ausgewachsenen *Mucor hiemalis* das radioaktive Carotin isoliert. Das gereinigte, kristallisierte β -Carotin ist oxydativ zu Essigsäure abgebaut worden. Die erhaltene Essigsäure ist sodann mit der Schmidtschen Reaktion zu den entsprechenden C_1 -Komponenten decarboxyliert worden, die auf ihre Radioaktivität hin geprüft worden sind¹.

Die Anordnung der C-Atome der Essigsäure im β -Carotin ist, soweit sie heute experimentell bestimmt worden ist, so, dass offenbar das Essigsäuremolekül als solches eingebaut wird. Zur Zeit sind wir damit beschäftigt, auch die Herkunft der übrigen C-Atome des β -Carotins zu bestimmen.

Alle bis anhin erzielten experimentellen Ergebnisse, die hier kurz zusammengefasst worden sind, führen uns zu der Hypothese, dass die Biosynthese der Carotinoide aller Wahrscheinlichkeit nach über Acetyl-Coenzym A führt und aus dem Fettsäurezyklus nach Lynen abzweigen muss, wie dies das Schema in Abbildung 2 zur Darstellung bringt. Wir betrachten als mögliche Abzweigungsstelle die Stufe des Acetoacetyl-Coenzym A. Man kann sich aus dem Acetoacetyl-Coenzym A die Bildung der β -Methylcrotonsäure, die schon mehrmals als eine niedere Vorstufe der natürlichen Isoprenederivate angesehen worden ist, leicht vorstellen, indem sich ein weiteres Essigsäuremolekül an das Acetoacetat anlagert und das entstandene Zwischenprodukt durch Dehydratisierung und Decarboxylierung in β -Methylcrotonsäure-Coenzym A übergeht.



Andererseits aber haben wir festgestellt, dass auch Säuren des Krebschen Zitronensäurezyklus Anlass zur Carotinbildung geben, wie zum Beispiel die Zitronensäure. Ferner sei auch noch erwähnt, dass wir bei den ersten Versuchen mit markierter Essigsäure² gefunden hatten, dass das β -Carotin aus Kulturen, die auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen sind, nur rund 70 % seines Kohlenstoffbestandes aus dem Acetat (CH_3 - und COOH -Gruppe) bezogen hat. Die restlichen

30 % hatten wir, da keine andere Kohlenstoffquelle vorhanden ist, einer Beteiligung des CO_2 der Luft zugeschrieben. Auch diese beiden Erscheinungen stehen nicht im Gegensatz zu der vorerwähnten Hypothese. Durch die Arbeiten von STERN, SHAPIRO, STADTMAN und OCHOA¹ ist gezeigt worden, dass die Zitronensäure in Gegenwart von Coenzym A in Acetyl-Coenzym A und Oxalessigsäure gespalten werden kann. Die Beteiligung des CO_2 der Luft an der Biosynthese der Carotinoide dürfte auch im Zusammenhang mit dem Krebschen Zyklus stehen, indem dort zweimal eine Carboxylierung stattfindet. Da ferner anzunehmen ist, dass ein Teil des in der Nährlösung vorhandenen Acetates in Pyruvat umgewandelt wird, findet auch durch das Pyruvat eine Aufnahme von CO_2 statt, woraus sich dann Oxalessigsäure bzw. Äpfelsäure bildet. Auf dem Wege des Krebschen Zyklus erhalten wir somit Acetyl-Coenzym A, welches seinen Kohlenstoff zum Teil aus CO_2 der Luft bezogen hat.

Wir sind zur Zeit damit beschäftigt, experimentell die hier entwickelten Vorstellungen über den Gang der Biosynthese der Carotinoide, soweit sie noch nicht gesichert sind, zu bearbeiten².

E. C. GROB und R. BÜTLER

Botanisches Institut der Universität Bern, den 8. Februar 1955.

Summary

Our experiments up to now lead us to the hypothesis, that the biosynthesis of carotenoids may be started on acetyl-coenzyme A. The condensation of two molecules of acetyl-coenzyme A leads to acetoacetyl-coenzyme A which can be regarded as the precursor of β -methylcrotonic acid. For a long time the latter compound was postulated as the precursor of the natural isoprene derivatives. The participation of the citric acid cycle in the biosynthesis of carotenoids is discussed.

¹ J. R. STERN, B. SHAPIRO, E. R. STADTMAN und S. OCHOA, J. biol. chem. 193, 703 (1951).

² Diese Arbeiten sind mit der Unterstützung der «Fritz-Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz» ausgeführt worden, der wir unseren besten Dank aussprechen.

A Micromethod for Measuring Photosynthesis

The method elaborated by the author has a sensitivity of the order $10^{-3} \mu\text{l}$ which permits the measurement of the gaseous metabolism in such small objects as single moss leaves a few square millimeters in area or alga filaments a few millimeters long. During the experiment, the plant material can be illuminated with light of known and changeable intensity and can be observed with at least $150\times$ magnification.

The technique is based on the principle of the capillary tube differential respirometer. The reaction and control chambers (the function of the latter consists in controlling temperature changes), both of the same capacity of about $50 \mu\text{l}$, are made as holes in a 2 mm thick brass plate. The holes are closed from below with a piece of glass fixed with "Araldite" and from above with a glass slide set on a vaseline ring. Two capillaries (with an elliptical bore) with a lumen of about 0.02 mm^2 and length of about 20 cm are fixed with their bend and funnel shaped ends in the immediate vicinity of the holes (Fig. 1).

¹ E. C. GROB und R. BÜTLER, Exper. 10, 250 (1954); Helv. chim. Acta 37, 1908 (1954).

² E. C. GROB, W. H. SCHOPFER und G. G. PORETTI, Int. Z. Vitaminforsch. 23, 484 (1952); W. H. SCHOPFER und E. C. GROB, Exper. 8, 140 (1952).

Time	Time from beginning of measurement min	Position of meniscus in capillary A cm	ΔV_A	Position of meniscus in capillary B cm	ΔV_B	$\Delta V_B \cdot I$	$\Delta V_A - \Delta V_B \cdot I$	
			0.01 mm		0.01mm	0.01 mm	· 0.01 mm	· 10 ⁻³ μ l
9.27	0	7.100	0	6.850	0	0	0	0
9.32	5	7.110	+ 10	6.835	- 15	- 13	+ 23	+ 6
9.37	10	7.140	+ 40	6.830	- 20	- 17	+ 57	+ 14
9.42	15	7.165	+ 65	6.845	- 5	- 4	+ 69	+ 18
9.47	20	7.205	+ 105	6.860	+ 10	+ 9	+ 96	+ 25
9.52	25	7.250	+ 150	6.885	+ 35	+ 30	+ 120	+ 31
9.57	30	7.305	+ 205	6.920	+ 70	+ 61	+ 144	+ 37

Drops of kerosene introduced to the capillaries serve as index droplets by means of which gas volume changes are measured. Into the bottom of the chamber 25 μ l of carbonate buffer (Warburg Nr. 10) are pipetted. Two leaves of about the same size are placed on a cover slide; one in a drop of water (reaction chamber), the other, having been killed by quick boiling, is dried on the slide and thinly coated with paraffin (control chamber). The slide after being turned over is put on the previously prepared vaseline ring. Thus the leaves are in a hanging drop and not in direct contact with the buffer solution. By applying convenient pressure on the cover slide the index droplets can be manoeuvred to occupy a similar position in the middle of the respective capillaries.

Both chambers (reaction and control) are illuminated with light which is reflected from the microscope mirror. When the chambers are illuminated with bright light, although this is passed through 10 cm of liquid cooler, the temperature of the chambers rises. Certain precautions, such as placing the two chambers together in medium which easily conducts heat, illuminating both chambers in the same way, placing a dead leaf of approximately the same absorption in a control chamber, help to ensure that both chambers are heated evenly.

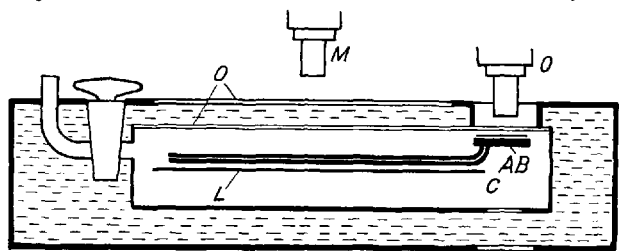


Fig. 2. Scheme illustrating box with water bath. AB plate with reaction and control chambers and capillaries, L Scale, C glass pane for observing the capillaries with microscope M and the chambers with microscope O.

The volume of the liquid phase is the same in both reaction and control chambers, and therefore the changes of temperature give the same differences in the volume of this phase. Differences in the displacement of the index droplet in the two capillaries may arise if the volume of gas phase in reaction (V_A) and in control (V_B) chambers are different. To eliminate this difference, the absolute value of V_A and V_B need not be known, it is sufficient to know the ratio $V_A : V_B = I$. This ratio is determined by measuring the displacement of the kerosene drops in the two capillaries when the air is compressed or decompressed in the compensation chamber. The ratio $D_A : D_B$, where D_A and D_B are the displacements of the drops in the tubes connected with the reaction and compensation chamber respectively, gives the value of I . In the calculation of experimental results, the mean of several determinations of I is used. By multiplying the displacement of the meniscus in the control chamber capillary by I a value is obtained which is exactly comparable with the meniscus displacement in the reaction chamber capillary.

Example of accord. *Funaria hygrometrica*. The area of the two leaves in the reaction chamber 1.68 mm². Area of internal cross section of capillaries 0.0257 mm². Temperature 21°. Coefficient $I = 0.875$. At 9.27 a.m. 480 lux illumination begins.

J. ZURZYCKI

Laboratory of Plant Physiology, Jagellonian University Cracow, Poland, November 3, 1954.

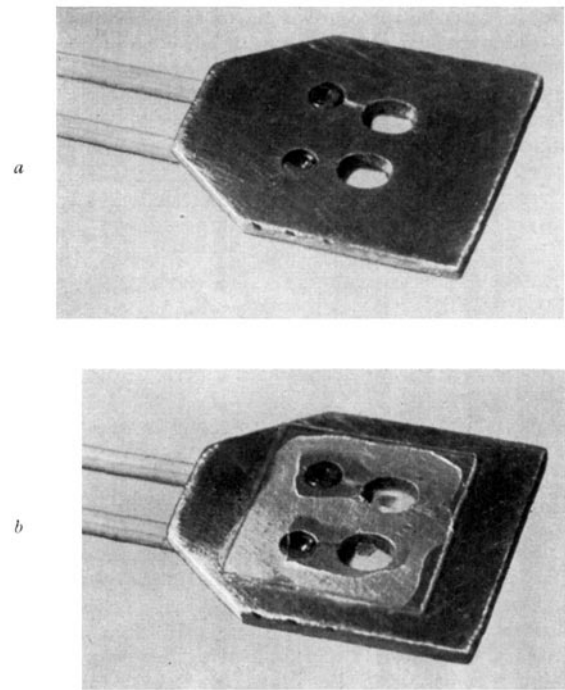


Fig. 1. Brass plate with reaction and control chamber: a open, b closed.

The chambers thus prepared with capillaries are introduced to the compensation chamber with a capacity of about 100 ml, made of sheet brass with a glass window above. This chamber is immersed in a water bath (Fig. 2).

A low power microscope serves to define the position of the index droplets with accuracy of 0.05 mm. A second microscope with a 10 $\times$ objective permits direct observation of the investigated plant material.

Zusammenfassung

Es wird eine Methode beschrieben, welche die Messung von Photosynthese oder Atmung kleinster Objekte, zum Beispiel einzelner Moosblättchen, erlaubt, mit einer Genauigkeit im Bereich von $10^{-3} \mu\text{l}$. Die verwendete Apparatur, die eine ständige Beobachtung des Objektes gestattet, ist nach dem Prinzip des Differentialkapillarenrespirometers gebaut. Das zu untersuchende Objekt befindet sich in einem hängenden Tropfen, ohne direkten Kontakt mit der Carbonatpufferlösung, die als CO_2 -Quelle dient. Mit Hilfe einer Kontrollkammer und einer besonderen Auswertungsmethode lassen sich durch Temperaturschwankungen verursachte Fehler ausgleichen.

The Dependence of Photosynthesis on the Arrangement of Chloroplasts

Little attention has so far been given to the influence exercised on photosynthesis by the arrangement of chloroplasts, although it has been established that the different positions occupied by the chloroplasts in the plant cell are not without effect on the amount of absorbed light energy (SCHANDERL and KAEMPFERT¹, ZURZYCKI²). To explain in what way the arrangement of chloroplasts modifies the rate of photosynthesis the course of photosynthesis with simultaneous observation of chloroplast position for 3 species, *Mougeotia* sp., *Funaria hygrometrica* and *Lemna trisulca*, was investigated with the aid of the method described in the foregoing report.

The change from weak light to darkness causes in the cells of *Lemna* or *Funaria* a transition of chloroplasts from a flat position (epistrophe) to the side cell walls (apostrophe). Respiration takes place at an unchanged rate all the time the leaf is in darkness. The movement of the chloroplasts to apostrophe is not connected with any measurable change in the rate of respiration.

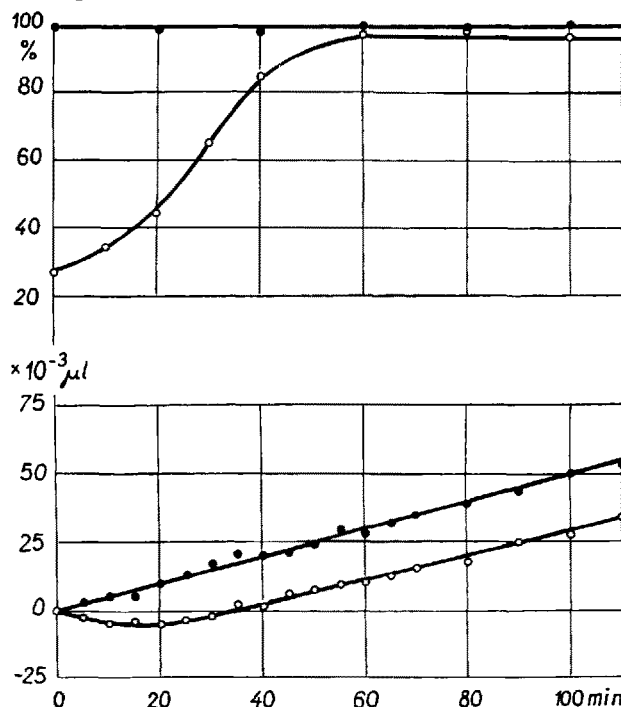
The displacement of chloroplasts from apostrophe to a flat position in weak light had an influence on the rate of photosynthesis. The assimilation is at first markedly lower, quickens after some time and reaches a constant value after 15–30 min. The time when the change of assimilation rate takes place corresponds fairly well with the time when chloroplast arrangement changes. The relation between assimilation and the chloroplast arrangement is extremely well visible in the case of *Mougeotia*. In this alga it is possible in the dark to keep both the flat and profile position of the chloroplast. Figure 1 shows the course of photosynthesis in the same alga filaments when the object is illuminated with light 430 lux after a dark period. In one case the chloroplasts are in a flat, and in the other in a profile position.

Very similar changes in photosynthesis may be observed when the chloroplasts move in weak light to epistrophe from a profile position caused previously by strong light (parastrophe).

When the chloroplasts are in epistrophe, strong light causes their quick movement to a profile position. The rate of photosynthesis does not change during the whole time the strong light acts. The rate of O_2 production is the same in the first minute when chloroplasts are still in a flat position as after 30 min, when all of them are already in parastrophe.

This phenomenon may be explained by the light curve of photosynthesis and the curve recording chloroplast arrangement. The light intensities which cause para-

strophe lie within the range of light intensities which have no further influence on photosynthesis. The movement of chloroplasts from a flat to a profile arrangement is always connected with a change of light absorption, but such a change influences the rate of photosynthesis only in low light intensities when light is the limiting factor (GÓRSKI¹). In strong light, the displacement of the chloroplasts has no such influence.



Mougeotia sp. Total length of filaments approximately 53 mm. Light 430 lux (before in darkness). —●— chloroplasts in darkness in flat, —○— in profile position. Upper curve: The change in the mean area of chloroplast expressed as percentage of cell areas. Lower curve: The oxygen production or consumption in $10^{-3} \mu\text{l}$ in time.

For all 3 investigated species the shape of the light intensity-photosynthesis curve shows some relation to the chloroplast arrangements. As long as the photosynthesis rate increases proportionally to the light intensity the chloroplasts are in epistrophe. Full parastrophe is reached approximately in those light intensities in which a further increase of intensity has no influence on photosynthesis.

J. ZURZYCKI

Laboratory of Plant Physiology, Jagellonian University Cracow, Poland, November 3, 1954.

Zusammenfassung

Der Zusammenhang zwischen Chloroplastenstellung und Photosynthese wird durch gleichzeitige Messung des Gasaustausches und Registrierung der Chloroplastenstellung untersucht. Die Bewegungen der Chloroplasten in Dunkelheit haben keinen Einfluss auf die Atmungsintensität. Die Bewegungen, welche im schwachen Licht zur Vergrößerung der Assimilationsfläche führen (Bewegung der Chloroplasten von Profilstellung, hervorgerufen durch Dunkelheit oder starkes Licht, zur Flächenstellung), bringen eine Steigerung der Assimilationsintensität. Dagegen schreitet die Photosynthese im starken Licht mit unveränderter Intensität fort. Sie ist unabhängig von den gleichzeitig verlaufenden Chloroplastenverlagerungen. Die Ergebnisse werden auf Grund des Minimumgesetzes diskutiert.

¹ H. SCHANDERL und W. KAEMPFERT, *Planta* 13, 700 (1933).

² J. ZURZYCKI, *Acta Soc. Bot. Pol.* 22, 299 (1953).

¹ F. GÓRSKI, *Acta Soc. Bot. Pol.* 22, 1 (1953).