

rate of Ca^{2+} uptake divided by the rate of the Ca^{2+} -activated ATP hydrolysis) at different temperatures are within the experimental error. Transport ratios obtained from various SR preparations ranged from 0.7 to 0.95, suggesting a stoichiometry of Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} -dependent ATP hydrolysis of 1. Similar values have been obtained previously for SR fractions prepared from calves¹⁰ and rabbits^{14,15}, which agree with transport ratios reported from several laboratories⁵⁻⁷. The Ca^{2+} -activated ATPase of the SR fractions represents about 90% of the ATPase activity (Figure 1) assayed in the presence of 5 mM azide. Azide does not influence the Ca^{2+} uptake of Ca^{2+} -dependent ATP splitting by the SR¹⁰, however the Ca^{2+} -independent ATPase activity is partially inhibited.

Straight lines were obtained by plotting the logarithms of the rate of Ca^{2+} uptake or the rates of the total-, basic- and Ca^{2+} -activated ATP hydrolysis against the reciprocal of the absolute temperature (Arrhenius

plot; Figure 2). The E_a for Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} -activated ATP hydrolysis obtained from 4 different SR preparations are practically the same and slightly lower for the Ca^{2+} -independent ATP hydrolysis (Table). Since the latter is partially inhibited by azide, a comparison with the values obtained for Ca^{2+} -dependent ATP splitting is not warranted.

A close correlation between the E_a for Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} -activated ATP hydrolysis by SR from skeletal muscle measured either in the presence or absence of oxalate was reported by INESI and WATANABE³, however the E_a were higher in the presence of oxalate. E_a for Ca^{2+} uptake in the absence of oxalate reported for cardiac SR (HARIGAYA and SCHWARTZ⁸; Millipore method) and for dog cardiac SR (Enntmann, Allen and Schwartz⁹; Murexide method) were 10 Kcal/mole⁻¹ and 6.5 Kcal/mole⁻¹, respectively. These values are clearly lower than those obtained in the present study. It might indicate a different rate limiting step of Ca^{2+} uptake by the cardiac SR measured either in the presence or absence of oxalate, similarly as proposed for skeletal muscle³.

Energies of activation for Ca^{2+} uptake and ATP hydrolysis by cardiac SR

	Energies of activation (Kcal/mole ⁻¹)
Ca^{2+} uptake	16.65 ± 0.87 (14.04–14.66)
Ca^{2+} -activated ATPase	17.93 ± 0.49 (16.83–19.22)
Total ATPase	17.50 ± 0.67 (15.82–19.22)
Basic ATPase	14.05 ± 1.29 (10.56–16.69)

The values are means \pm SEM obtained from 4 different SR preparations. The minimal and maximal values are given in parentheses. The E_a were calculated from the equations: $\log V = -A/T + B$ and $E_a = R \times 2,303 \times A$. Arrhenius plots were prepared and the slopes (A) determined by regression analysis. E_a , activation energy (Kcal/mole⁻¹); R, $1,987 \times 10^{-3}$ Kcal/°K⁻¹/mole⁻¹.

Zusammenfassung. Der Ca^{2+} -Transport und die Ca^{2+} -aktivierte ATP Hydrolyse (ATP extra Spaltung) durch Membranen des cardialen sarkoplasmatischen Retikulums zeigen die gleiche Temperaturabhängigkeit. Die Aktivierungsenergie der Ca^{2+} -Aufnahme und der ATP extra Spaltung, gemessen bei Anwesenheit von Oxalat, beträgt 16.65 ± 0.87 und 17.93 ± 0.49 Kcal/Mol⁻¹.

J. SUKO

Pharmakologisches Institut der Universität Wien,
Währinger Strasse 13a, A-1090 Wien (Österreich),
28 September 1972.

¹⁴ J. Suko, Biochim. biophys. Acta 252, 324 (1971).

¹⁵ J. Suko, J. Physiol., Lond. 228, 563 (1973).

Beiträge zum Stickstoffmetabolismus in grünen Pflanzen. I. Die reversible Plastidenumwandlung in glucosestimulierten Kulturen von *Spirodela oligorrhiza*, eine Folge von Stickstoffmangel

Das Wachstum von *Spirodela oligorrhiza* auf sterilen, glucosehaltigen Nährlösungen ist – verglichen mit Kontrollen auf glucosefreiem Milieu – gekennzeichnet durch eine nach 15–20 Tagen einsetzende äusserliche Vergilbung und eine auffällige Veränderung der Plastidenfeinstruktur. Dabei verlieren die Chloroplasten ihre charakteristische Thylakoidstruktur und gehen unter Veränderung ihrer typischen Lipidzusammensetzung und unter Anhäufung von Stärke schliesslich in Amyloplasten über¹⁻³. Bei Zusatz neuer Stickstoffquellen zur verbrauchten Nährlösung findet unter äusserlicher Wiederergrünung der Pflanzen¹ eine Regeneration des Lamellarsystems der Plastiden statt², was bedeutet, dass für die Vergilbung primär der durch einen beschleunigten Verbrauch der Stickstoffquellen der Nährlösung entstandene Stickstoffmangel verantwortlich ist. Ähnliche Veränderungen der Feinstruktur und der stofflichen Zusammensetzung wurden auch in Plastiden von *Chlorella protothecoides* auf acetathaltigem Milieu⁴ und von *Chlorella fusca* und *Ankistrodesmus braunii* unter N-Mangelbedingungen erzeugt⁵.

Andererseits geht aus Gaswechsellmessungen und Markierungsversuchen deutlich hervor, dass in glucosestimulierten Pflanzen von Anfang an die Nettoassimilation von CO_2 herabgesetzt ist¹, und dass die angebotene Glucose

in Stärke eingebaut und somit auch in den Stoffwechsel eingeschleust wird⁶. Diese Vorgänge werden bereits unter optimaler Stickstoffernährung induziert und sind als Anzeichen eines Überganges von autotropher zu heterotropher Lebensweise zu werten. Da *Spirodela* im Dunkeln vollständig heterotroph leben kann¹, wäre denkbar, dass unter Glucoseernährung über genügend lange Zeit diese Umstellung bereits unter Lichtbedingungen erfolgen kann, und dass die beobachtete Vergilbung glucosestimulierter Kulturen somit ausser auf einen N-Mangel teilweise auf eine direkte Wirkung der exogenen Glucose zurückzuführen ist.

Zur Beantwortung dieser Frage haben wir das Verhalten von Pflanzen untersucht, die unter genügender N-Ernährung während längerer Zeit auf glucosehaltiger Nährlösung gezogen wurden. Ferner wurden anhand elektronenoptischer Aufnahmen geprüft, ob eine Rege-

¹ J. RUFENER, Dissertation Bern 1966.

² E. C. GROB und J. RUFENER, Proc. Int. Congr. Photosynth. Res. 1969, vol. 1, p. 55.

³ E. C. GROB und W. EICHENBERGER, FEBS Lett. 5, 335 (1969).

⁴ I. SHIHARA und E. HASE, Pl. Cell Physiol. 5, 227 (1964).

⁵ F. MAYER und F.-C. CZYGAN, Planta 86, 175 (1969).

⁶ E. C. GROB und G. VON GLUTZ, unpubliziert.

neration der Plastiden vergilbter Pflanzen auch in Gegenwart von exogener Glucose erfolgt.

Material und Methoden. Kulturen von *Spirodela oligorrhiza* (Stamm 22'01'76') wurden auf steriler Nährlösung, die 1% Glucose enthielt, angezogen³.

Um den Einfluss andauernder Glucoseernährung zu verfolgen, wurden aus 7 Tage alten und völlig grünen, glucosestimulierten Kulturen 100 Versuchsglieder gleicher Grösse ausgelesen und, damit diese innerhalb der laufend sich neu bildenden Glieder jederzeit wiedererkannt werden konnten, mit einer Spur sterilen Talkpulvers bestreut. Die markierten Glieder wurden nach jeweils 7 Tagen samt den zugehörigen Kolonien steril auf frische glucosehaltige Nährlösung übertragen. Als Kontrollen wurde eine gleiche Zahl von Gliedern einerseits auf glucosefreie Nährlösung übertragen und andererseits während der ganzen Versuchsdauer auf der Mutterkultur selber zurückbelassen. Die Veränderungen wurden quan-

titativ erfasst, indem periodisch ausgezählt wurde, wieviele Versuchsglieder auf die festgelegten 4 Kategorien grün, leicht gelblich, gelb und weiss (abgestorben) entfielen.

Zur Verfolgung der Plastidenregeneration anhand von Dünnschnitten wurden aus 18 Tage alten vergilbenden Kulturen 200 noch leicht grünstichige Glieder gleicher Grösse ausgelesen und mit Talkpulver markiert. Die Hälfte der Blättchen wurde auf frische Nährlösung mit Glucosezusatz, die andere Hälfte als Kontrolle auf glucosefreie Nährlösung übertragen. Im Abstand von 2, 4, 6, 9 und 12 Tagen nach der Übertragung wurden jeweils mehrere markierte Glieder entnommen und für die Elektronenmikroskopie präpariert^{1,2}.

Resultate und Diskussion. Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen geht hervor, dass in den Plastiden, die vor der Regeneration vollständig mit Stärke gefüllt sind, bei Übertragung auf glucosehaltige Nährlösung

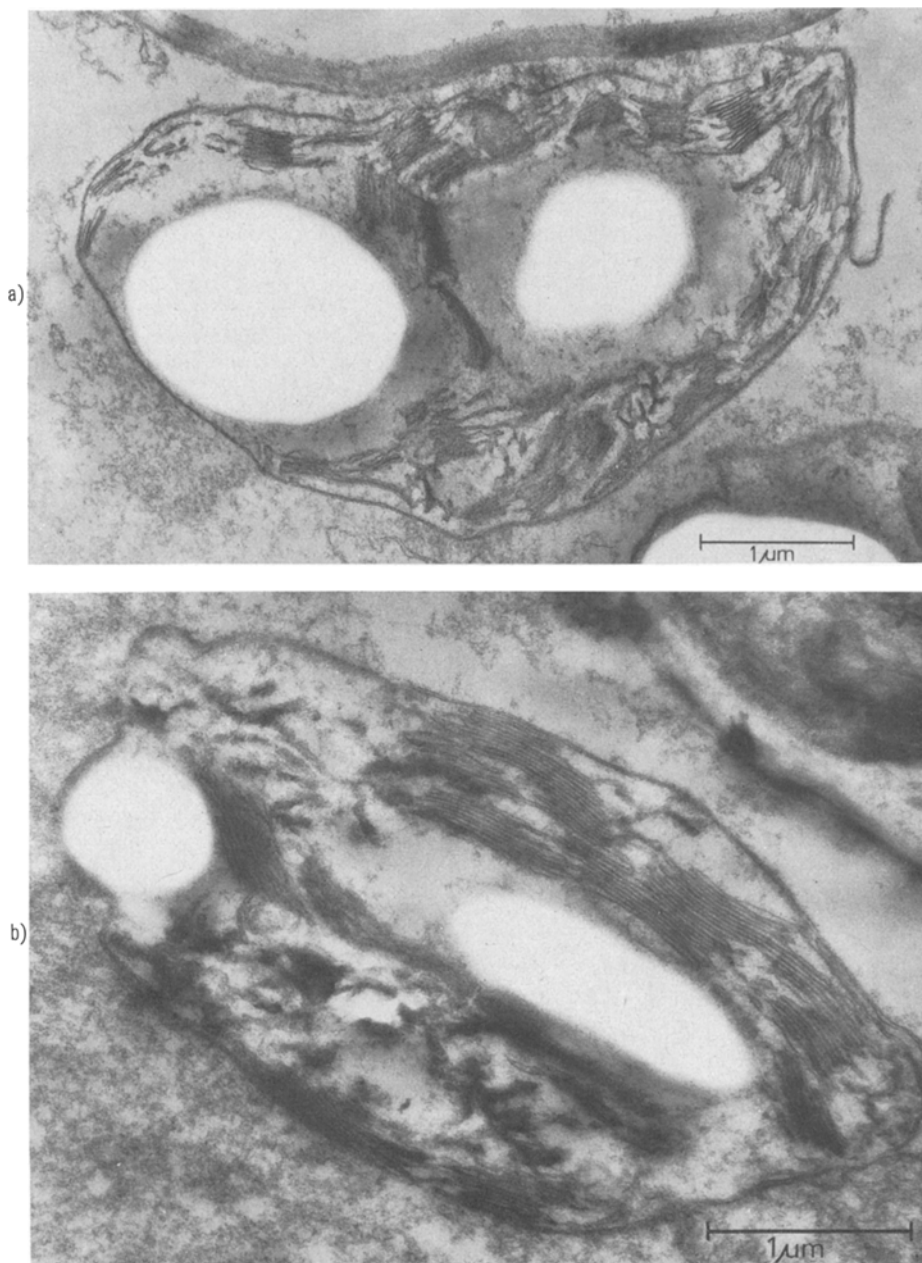


Fig. 1. Chloroplasten von *Spirodela oligorrhiza*, regeneriert auf glucosehaltiger Nährlösung, KMnO_4 -fixiert. a) Regenerationszeit 6 Tage. $\times 20,000$. b) Regenerationszeit 12 Tage. $\times 27,000$.

sofort ein Abbau von Stärke und eine Zunahme der Lamellarstrukturen einsetzt. Nach 2 Tagen ist ein grosser Teil der Stärke abgebaut, und die Plastiden bieten dasselbe Bild wie die von Kontrollgliedern, die auf glucosefreier Nährlösung regeneriert wurden. Während in den Kontrollen die Plastiden im Verlauf von 6 Tagen jedoch vollständig stärkefrei werden, verlangsamen sich aus glucosehaltiger Nährlösung Stärkeabbau und Membranbildung nach dem 2. Tag immer mehr und führen nach 6 Tagen zu einem stationären Zustand. Plastiden dieses Stadiums enthalten, wie aus Figur 1a hervorgeht, noch immer Stärkekörner von beachtlicher Grösse, daneben aber zahlreiche neugebildete Thylakoide. Wie Figur 1b zeigt, ist dieser Zustand auch nach 12 Tagen noch unverändert. Noch spätere Stadien wurden nicht mehr untersucht, weil dann, wie an den Pflanzen äusserlich leicht erkennbar ist, der Vergilbungsvorgang erneut anläuft.

Aus diesen Ergebnissen folgt einwandfrei, dass in vergilbten Pflanzen die Regeneration der Plastiden einsetzt, sobald dem Organismus wieder resorbierbare N-Quellen zur Verfügung gestellt werden, gleichgültig, ob exogene Glucose zugegen ist oder nicht. Umgekehrt ist daher zu erwarten, dass an Pflanzen, denen genügende Mengen resorbierbarer N-Quellen zur Verfügung stehen,

trotz fortwährender Glucosezufuhr eine Vergilbung nicht eintritt. Diese Vermutung wird anhand eines Versuches mit kontinuierlicher Glucoseernährung bestätigt.

Das typische Bild einer glucosestimulierten und vergilbenden Kultur ist zum Vergleich in Figur 2a dargestellt. Von den anfänglich zu 100% grünen Einzelgliedern sind nach bereits 17 Tagen mehr als die Hälfte gelb gefärbt und nach 22 Tagen 90% abgestorben. Bei wöchentlicher Übertragung der Pflanzen auf frische Nährlösung (Figur 2b) sind nach 22 Tagen bei nur 20% der Glieder schwache Farbveränderungen festzustellen, welche stationär bleiben und daher nicht als Vergilbung im obigen Sinn zu werten sind. Die Mehrzahl der Glieder bleibt, gleich wie im Kontrollversuch mit glucosefreier Nährlösung (Figur 2c), während der ganzen Zeit grün. Ob die Tatsache, dass der Prozentsatz der nach 30 Tagen noch vollständig grünen Glieder in Anwesenheit von Glucose höher ist, auf eine verjüngende Wirkung der Glucose zurückgeführt werden kann, bleibt fraglich. Nach dem 30. Tag beginnen die Versuchsglieder beider Kulturen vom Rande her abzusterben, eine Erscheinung, die das Ende der normalen Lebensdauer der Blättchen anzeigen dürfte.

Wie aus diesen Befunden hervorgeht, lässt sich an *Spirodela oligorrhiza* eine Vergilbung, wie sie in glucosestimulierten Kulturen normalerweise auftritt, durch Glucose allein nicht induzieren. Zusammen mit der Tatsache, dass eine Regeneration der Plastiden vergilbter Pflanzen auch in Gegenwart von Glucose erfolgt, ist dies ein eindeutiger Beweis dafür, dass die Vergilbung und der damit verbundene vollständige Verlust der Photosyntheseaktivität ausschliesslich eine Folge des durch beschleunigten Verbrauch der Nährlösung entstandenen N-Mangels sind. Wie es zur frühzeitigen Herabsetzung der Nettoassimilation von CO_2 kommt und welches die direkten Ursachen der beschleunigten Stickstoffaufnahme sind, wird in weiteren Arbeiten untersucht^{7,8}.

Summary. The regeneration of plastids of *Spirodela oligorrhiza* grown on a glucose-containing nutrient was investigated. Yellow leaflets transferred to a fresh nutrient turn green again and the lamellar system of their plastids regenerates within 2 days, whether or not exogenous glucose is present in the medium. Green leaflets of the same plant transferred weekly to a fresh nutrient containing glucose keep their green coloration over a period of at least 32 days. It is concluded that in glucose-stimulated plants changes of color and of chloroplast ultrastructure are exclusively induced by a nitrogen deficiency and not by the exogenous glucose itself.

E. C. GROB† und W. EICHENBERGER

Institut für organische Chemie der Universität,
Länggassstrasse 7, CH-3012 Bern (Schweiz),
19. September 1972.

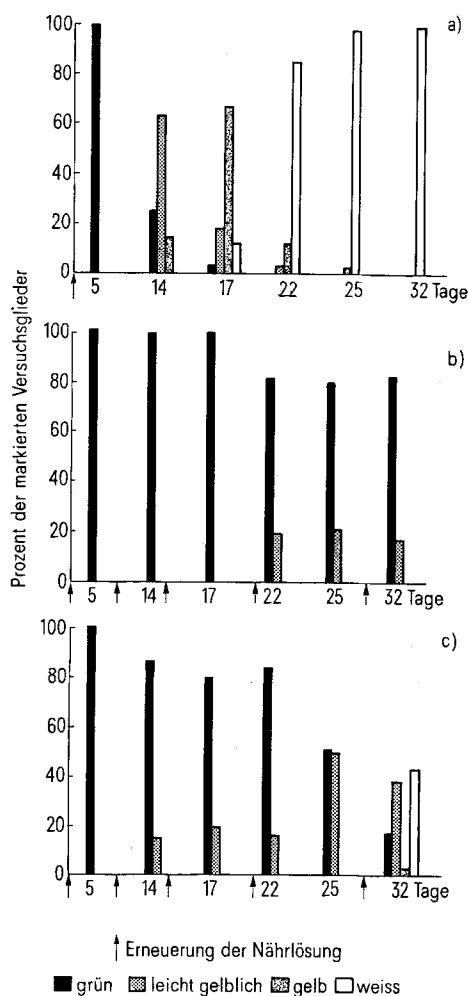


Fig. 2. Farbveränderungen an je 100 markierten Einzelgliedern von *Spirodela oligorrhiza* auf glucosehaltiger Nährlösung. a) Nährlösung mit Glucose, nicht erneuert (Vergilbung); b) Nährlösung mit Glucose, erneuert. c) Nährlösung ohne Glucose, erneuert.

⁷ Die Arbeiten wurden durch den Schweizerischen Nationalfonds unterstützt.

⁸ Die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit dem Zoologischen Institut der Universität Bern durchgeführt.

† Verstorben am 31. Mai 1972.