

Chloramphenicol-Einfluß auf die ^{14}C -Aufnahme isolierter Gerstenwurzeln aus $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$

In einer früheren Untersuchung¹⁾ wurde nachgewiesen, daß 2,4-Dinitrophenol, Natriumarsenat und Natriumazid in 10^{-5} bis 10^{-8} molaren Konzentrationen die ^{14}C -Aufnahme isolierter Gerstenwurzeln aus $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ bis zu 50% und mehr reduzieren, und darin ein Beweis erblickt für die Abhängigkeit der ^{14}C -Aufnahme von energieliefernden physiologischen Vorgängen, wie sie die durch die genannten Zellgifte direkt oder indirekt gehemmte oxydative Phosphorylierung darstellt. Zur Erhärtung dieser Ergebnisse schien es angebracht, bei neuen Versuchen einen Inhibitor zu verwenden, von dem eine Beeinflussung der Respiration nicht zu erwarten war. Wir verwendeten Chloramphenicol, von dem bekannt ist, daß es über die Proteinsynthese die Aufnahme mehrerer Kationen und Anionen beeinflusst, dabei aber keine Veränderung der Respiration bedingt²⁻⁴⁾. Als Handelsprodukt erhält man Paraxin = Chloramphenicol Boehringer, puriss. crist., das ein durch Totalsynthese gewonnenes linksdrehendes, mit dem natürlichen Chloramphenicol identisches Chloramphenicol darstellt.

Versuchsanstellung. Wie früher¹⁾ wurde zu je 6 g frischer Gerstenwurzeln in einer auf pH 8,0 gepufferter Aufnahme-lösung 1 mg $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ gegeben und dessen Aufnahme nach 1, 2 und 3 Std ermittelt. Neben Kontrollen ohne Paraxin liefen Versuche mit Paraxinkonzentrationen von 5 mM, 7,5 mM und 10 mM. Ein Parallelversuch diente dem Studium der ^{32}P -Aufnahme aus $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ unter den gleichen Bedingungen. Ermittelt wurden die Gesamtaufnahme sowie die ^{14}C -Aktivität der heißwasserlöslichen Stoffe (ohne lösliche Eiweißstoffe), des löslichen Eiweißes und der Fraktion der heißwasserlöslichen organischen Säuren und sauren Aminosäuren.

Versuchsergebnisse. Ohne Paraxin stieg die ^{14}C -Aufnahme während der ersten beiden Stunden fast kontinuierlich an, erreichte dann aber ein Maximum, das auch nach dreistündiger Versuchsdauer nicht wesentlich überschritten wurde. Diese Tendenz läßt sich sowohl bei der Gesamtaufnahme wie in allen isolierten Fraktionen erkennen (Tabelle 1).

Tabelle 1. ^{14}C -Aufnahme durch 6 g isolierte Gerstenwurzeln

Paraxin	Aufnahme	Gesamt-aufnahme	In H_2O löslich	Org. Säuren *)
Ohne P	1 Std	24200	19200	9550 Imp/min
	2 Std	41500	29000	21800 Imp/min
	3 Std	42250	29900	22500 Imp/min
5 mM	1 Std	24800	16200	11850 Imp/min
	2 Std	26150	13400	8650 Imp/min
	3 Std	33000	16100	10400 Imp/min
7,5 mM	1 Std	12550	6650	4700 Imp/min
	2 Std	12200	8100	4750 Imp/min
	3 Std	11800	8500	3600 Imp/min
10 mM	1 Std	9100	7500	5500 Imp/min
	2 Std	4950	7450	3150 Imp/min
	3 Std	5900	6900	3650 Imp/min

*) In H_2O lösl. org. Säuren und saure Aminosäuren.

Die Wurzeln in der Aufnahmelösung mit 5-molarer Paraxinkonzentration nehmen in der ersten Stunde etwa die gleiche ^{14}C -Mengen wie die Kontrollreihen auf, doch zeigte die Aufnahme nach 2 Std einen deutlichen Abfall. In 7,5- und 10-molarer Paraxinlösung tritt die Hemmung jedoch schon nach 1 Std auf. Offenbar läßt sich die notwendige Reaktionszeit bis zum Auftreten einer Paraxinwirkung, wie sie schon früher erkannt wurde^{3), 4)}, durch höhere Konzentrationen verkürzen.

Die zeitbedingte Wirkung kam auch bei Vorbehandlung der Wurzeln mit Paraxin zum Ausdruck. Eine dreistündige Aufbewahrung der Wurzeln in gepufferten Lösungen ohne und mit Paraxin, an die sich der eigentliche Aufnahmeversuch mit 1 bzw. 2 Std Aufnahmezeit anschloß, ergab in den Paraxin-Reihen erheblich niedrigere ^{14}C -Werte in den Wurzeln als im Normalversuch ohne Vorbehandlung.

Ebenso wie die ^{14}C -Aufnahme aus $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ wurde auch die ^{32}P -Aufnahme aus $\text{KH}_2^{32}\text{PO}_4$ durch Paraxin deutlich gehemmt, was sich mit früheren bei der Aufnahme von Na^+ und SO_4 gewonnenen Ergebnissen^{3), 4)} deckt (Tabelle 2). Zusätzlich zu der Tatsache, daß Paraxin (Chloramphenicol) nicht die Respiration beeinflusst, sprechen diese Ergebnisse für eine Hemmung der ^{14}C -Aufnahme auf einem anderen Weg als über die Respiration.

Da vermutet wird, daß die Wirkungen des Chloramphenicols auf einer Behinderung der Eiweißsynthese beruhen, wurde in einem Teil der Wurzeln nach Versuchsende die Aminosäurezusammensetzung chromatographisch untersucht.

Tabelle 2. ^{32}P -Aufnahme isolierter Gerstenwurzeln, und zwar je 6 g fr. Wurzeln

Paraxinkonzentration	ohne P.	5 mol	10 mol
2 Std Aufnahme . . .	41790	14485	13500 Imp/min
3 Std Aufnahme . . .	56210	14425	12977 Imp/min

Die photometrische Auswertung ließ keine Unterschiede zwischen Kontrolle und Paraxin-Reihen erkennen, doch lag die ^{14}C -Aktivität im Alanin der Paraxin-Wurzeln relativ höher als in der Glutaminsäure, worin eine Bestätigung der Ergebnisse von PEAUD-LENOEL und DE GOURNAY-MARGERIE gesehen werden kann.

Institut für Pflanzenernährung der Universität, Gießen
(Direktor: Prof. Dr. H. LINSER)

WERNER HÖFNER

Eingegangen am 28. Juni 1963

¹⁾ HÖFNER, W.: Atompraxis 9, 82 (1963). — ²⁾ CALO, N., u. S. E. VARNER: Plant Physiol. 32, 46 (1957). — ³⁾ SUTCLIFFE, S. F.: Nature 188, 294 (1960). — ⁴⁾ PEAUD-LENOEL, C., u. C. DE GOURNAY-MARGERIE: Phytochemistry 1, 267 (1962).

Observations on P 750 A from *Anacystis nidulans*

LIPPINCOTT et al.¹⁾ and AGHION²⁾ have prepared chloroplast fragments having an absorption maximum at 740 m μ . In an independent study, GOVINDJEE³⁾ has shown that when 65% methanol in water is added to *Anacystis* cells, a sharp absorption peak appears at 750 m μ with a simultaneous decrease in the absorption at 674 m μ . The pigment thus formed is referred to as P 750 A [A stands for artificial to distinguish it from the naturally occurring pigment^{4), 5)} for which the name P 750 N is proposed]. Observations concerning the preparation and the characterization of pigment P 750 A, are described in the present communication.

Preliminary experiments had revealed that 60–65% methanol treatment was best for producing P 750 A. About 200 μl (packed cell volume) of *Anacystis* cells were suspended in 20 ml of 60–65% methanol and heated to 60–70° C for 1–2 minutes (or kept for 2–3 hours at 25° C). The algae were centrifuged down (Precision Vari Hi Speed Centrifuge, model J-10) at 3000 rpm for 10 minutes. The sediment, the algal cells, contained the unextracted and altered phycobilins. The supernatant was recentrifuged in aspinco centrifuge at 35,000 rpm for 1 hour at 0° C. The P 750 A appeared as the fluffy green precipitate. It was suspended in 65% methanol.

Fig. 1 shows the absorption spectrum of P 750 A suspended in 65% methanol (the curve with crosses). There are two main peaks, one at 750 m μ and the other at 450 m μ . A comparison of this spectrum with the already published spectra of other pigments absorbing in the 750 m μ region [e.g. microcrystalline chlorophyll⁶⁾, microcrystalline chlorophyllide⁷⁾, bacterioviridin⁸⁾ and bacterio-phaeophytin⁹⁾] was made. A closer resemblance both in the location and the relative heights of the peaks was found between P 750 A and microcrystalline chlorophyll. (Ratio of O.D. blue peak to red peak is 0.90.)

The following observations were made on P 750 A: (1) When 1 volume of 65% methanol solution of P 750 A was added to 2 volumes of 100% methanol, the P 750 A was irreversibly converted to a chlorophyll *a* type pigment (see curve with dots in Fig. 1). (2) The suspension of P 750 A in 65% methanol is greenish but does not have the typical green color of chlorophyll *a*. (3) The suspension shows a tyndall effect and the pigment is therefore not in a true solution. (4) If diethyl ether is added to a 65% methanol solution of P 750 A and the two liquids gently shaken, the pigment goes into the ether layer and gives a chlorophyll *a* type spectrum.

Several tests⁹⁾ were made on the ethereal solution of chlorophyll *a* type pigment obtained via P 750 A. (1) 22% HCl-ether and 0.01 N sodium bicarbonate-ether partition test — the pigment stayed in ether suggesting that it is not a chlorophyllide or phaeophorbide. (2) Color, it is not brown or neutral tint — this indicates that it is not a phaeophytin. (3) The phase test was negative.

All the above observations indicate that P 750 A may simply be an aggregated allomerized chlorophyll *a* (there is no chlorophyll *b* in *Anacystis*).

The existence of the natural pigment, P 750 N, has been confirmed. The nature and the role of P 750 N is under careful

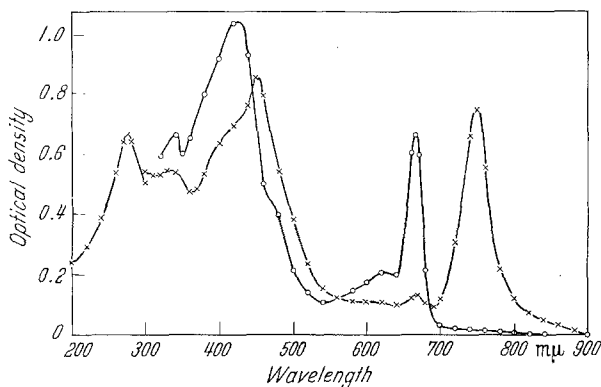


Fig. 1. Absorption spectrum of P 750A prepared from *Anacystis nidulans* (curve with crosses). The curve with dots is the absorption spectrum of chlorophyll *a* type pigment prepared via P 750A. These spectra were measured with a Cary spectrophotometer, model 14 and are replotted here

investigation. Preliminary experiments of GOVINDJEE and SPENCER (unpublished) suggest that P 750 N is a fluorescent species.

This work was supported by National Science Foundation grant G 19437.

Botany Department, University of Illinois, Urbana, Ill.

GOVINDJEE

Eingegangen am 3. Juli 1963

1) LIPPINCOTT, J. A., J. AGHION, E. PORCILE and W. F. BERTSCH: Arch. Biochem. Biophys. 98, 17 (1962). — 2) AGHION, J.: Biochim. et Biophys. Acta 66, 212 (1963). — 3) GOVINDJEE, R.: Thesis, Univ. of Illinois (1961). — 4) GOVINDJEE, C. CEDERSTRAND and E. RABINOWITZ: Science 134, 391 (1961). — 5) GASSNER, E.: Plant Physiol. 37, 637 (1962). — 6) JACOBS, E. E., and A. S. HOLT: J. Chem. Phys. 22, 142 (1954). — 7) JACOBS, E. E., A. S. HOLT, R. KROMHOUT and E. RABINOWITZ: Arch. Biochem. Biophys. 72, 495 (1957). — 8) RABINOWITZ, E.: Photosynthesis and Related Processes, vol. 2, (Part II), p. 4855. New York: Interscience Publ. Inc. 1956. — 9) SMITH, J. H. C., and A. BENITEZ: In: Modern Methods of Plant Analysis (K. PAECH and M. V. TRACEY, eds.), vol. IV, p. 142. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

Über ein pektolytisches Enzym von *Phytophthora infestans* de By.

Pektinasen von *Phytophthora infestans* scheinen bisher nicht bekannt geworden zu sein. Unter zahlreichen Erregern von Pflanzenkrankheiten, die auf ihre Fähigkeit, pektische Enzyme zu bilden, geprüft wurden, versagte nur *Ph. infestans*¹⁾. Diese merkwürdige Tatsache mag teilweise durch die Schwierigkeiten bedingt sein, die bisher eine Kultur des Pilzes in vitro erschwerten. Die Entwicklung neuer Nährmedien, die ein gutes Wachstum von *Phytophthora* ermöglichen, durch GAERTNER²⁾ gab uns Gelegenheit, diese Frage noch einmal aufzugreifen.

Die von uns verwendete Nährlösung baut auf einem Dekokt aus autoklavierten Kartoffelknollen auf und enthält neben verschiedenen anorganischen Salzen Zusätze von Vitamin B₁ und B₆ sowie Cystein; als zusätzliche C-Quellen wurden Glukose und/oder Pektin bzw. Carboxymethylcellulose hinzugefügt. Auf dieser Lösung wurde ein Stamm von *Ph. infestans* (Rasse 4) bei 20° C kultiviert. Dabei stellte sich heraus, daß mit zunehmendem Wachstum des Pilzes im Kulturfiltrat Enzyme auftreten, die in Frage sind, Pektin abzubauen (viskosimetrische Bestimmung); durch Autoklavieren werden diese Enzyme zerstört. Durch die Art der zusätzlichen C-Quellen scheint die Aktivität der Kulturfiltrate nur insoweit beeinflusst zu werden, als sie das Pilzwachstum fördern. Eine spezielle adaptive Bindung der Enzymproduktion an das Vorhandensein von Pektin in der Nährlösung besteht offenbar nicht; doch ist einschränkend darauf hinzuweisen, daß infolge der Verwendung des Kartoffeldekokts in jedem Falle pektische Substanzen in den Medien enthalten gewesen sein dürften. Bei verschiedenen langer Kultur des Pilzes nimmt die pektolytische Aktivität des Kulturfiltrates etwa vom 17. Tage an nur noch wenig zu (Tabelle); in keinem Falle wird die Aktivität

Tabelle. Abbau einer Pektin-Lösung durch Filtrate verschieden alter *Phytophthora*-Kulturen im Vergleich zu einem Filtrat von *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*

Filtrat von	Viskositätsminderung in cP (Zentipoise)
<i>Phytophthora</i> -Nährlösung, unbeimpft	—0,03
<i>Phytophthora</i> -Kultur, 10 Tage alt	1,21
<i>Phytophthora</i> -Kultur, 17 Tage alt	2,24
<i>Phytophthora</i> -Kultur, 24 Tage alt	2,46
<i>Phytophthora</i> -Kultur, 31 Tage alt	2,45
<i>Fusarium</i> -Kultur, 31 Tage alt	3,24

eines zum Vergleich herangezogenen Filtrates von *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*³⁾ erreicht. Das pH-Optimum für den Pektin-Abbau liegt bei 4,5. Pektinsäure wird, vor allem in den Anfangsstadien, rascher abgebaut als Pektin (Fig. 1).

In Mazerationsversuchen waren die *Phytophthora*-Kulturfiltrate überraschenderweise nicht in der Lage, Gewebe von Kartoffeln, Möhren und Gurken anzugreifen. Die Pektinmethyl-esterase-Aktivität war sehr gering und ebenfalls nicht spezifisch von der zusätzlichen C-Quelle abhängig. Eine Freisetzung reduzierender Aldehyd-Gruppen, die bei der Spaltung glykosidischer Bindungen innerhalb der Pektinsäureketten eintreten müßte, ließ sich jodometrisch nicht sicher nachweisen; sie muß zumindest sehr gering sein. Monogalakturonsäure war auch bei verlängerter Einwirkung auf Pektin bzw. Pektinsäure nicht nachweisbar. Ebensov wenig konnte eine Zellulase (C₂)-Aktivität der Kulturfiltrate festgestellt werden.

Unsere Ergebnisse zeigen ohne Zweifel, daß auch *Phytophthora infestans* über pektolytische Enzyme verfügt. (Das Freisetzen der von uns verwendeten Kultur von Verunreinigungen mikrobieller Art wurde mehrfach durch Ausstreichen auf Fleischextrakt-Pepton-Agar überprüft). Die ermittelten Daten deuten auf eine Endopolysaccharidase nach der Klassifizierung von DEMAIN und PHAFF⁴⁾ hin. Der Pektin-Abbau ist aber offenbar begrenzt. Der mangelnde Nachweis reduzierender Gruppen und vor allem das Fehlen einer mazerierenden Potenz bei gleichzeitiger pektolytischer Aktivität werfen Fragen auf, die hier nicht im einzelnen erörtert werden können. Es sei jedoch vermerkt, daß sich in letzter Zeit Hinweise mehreren, wonach pektolytische und mazerierende Faktoren nicht identisch zu sein brauchen⁵⁾.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz der Universität, Göttingen (Direktor: Prof. Dr. W. H. FUCHS)

F. GROSSMANN

Eingegangen am 19. Oktober 1963

1) WOOD, R. K. S., in: J. G. HORSFALL u. A. E. DIMOND, Plant Pathology, vol. II, p. 253. New York u. London: Acad. Press 1960. — 2) GAERTNER, A.: Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., Abt. II 111, 121—122 (1958); — Arch. Mikrobiol. 32, 261—269 (1959). — 3) GROSSMANN, F.: Phytopathol. Z. 44, 361—380 (1962). — 4) DEMAIN, A. L., u. H. J. PHAFF: Wallerstein Lab. Commun. 20, 119—140 (1957). — 5) BYRDE, R. J. W., u. A. H. FIELDING: Nature 196, 1227—1228 (1962).

A Note on the Vacuolar System of Two Species of *Cunninghamella*

This note deals with the study of the vacuolar system of *Cunninghamella echinulata* THAXTER and *Cunninghamella bertholletiae* STADEL which were isolated by the authors from a soil sample obtained from the Agriculture Farm of the Allahabad University. Vegetative mycelium was obtained by growing the fungus for about 24 hours in 1% bacto peptone solution at 25° C. The studies were carried out under living condition both with and without the help of vital dyes dissolved in RINGER's solution [1^a,^b], p. 25].

The actively growing broad hyaline hyphae possessed a number of minute bodies moving passively in the cytoplasm,

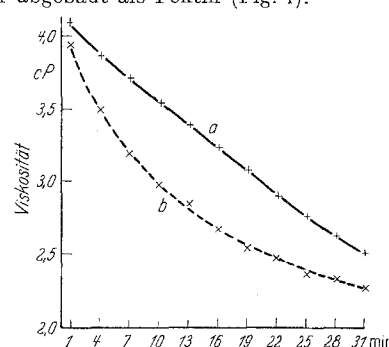


Fig. 1. Abbau von Pektin- bzw. Pektinsäure-Lösungen durch ein *Phytophthora*-Kulturfiltrat bei pH 4,5. Abszisse: Zeit (min). Ordinate: Viskosität (Zentipoise)