

UEBER DIE GALACTOLIPIDE UND FETTSÄUREN IN NORMALEN UND GLUCOSESTIMULIERTEN KULTUREN VON *SPIRODELA OLIGORRHIZA*

E.C.GROB und W.EICHENBERGER

Institut für organische Chemie der Universität Bern

Received 3 November 1969

The levels of galactosyl diglycerides and the composition of fatty acids of *Spirodela oligorrhiza* (Lemnaceae) plants cultivated on a nutrient containing 1% glucose were studied. Controls were grown on a medium without glucose. Between the 10th and the 25th day of growth the ether-soluble lipids of glucose-stimulated plants contained less monogalactosyl diglyceride (MG) but more digalactosyl diglyceride (DG) than controls. In the same time a marked decrease of the relative amount of C_{18:3} acid and an increase of that of C_{18:2} and C_{16:0} acids was observed. These changes of the lipid composition might be one reason for the structural changes in the chloroplast fine structure of glucose-stimulated *Spirodela* plants.

1. Einleitung

Das Wachstum von *Spirodela oligorrhiza* (Lemnaceen), einer höheren grünen Pflanze, auf zuckerhaltigen Nährlösungen ist durch zwei äussere Erscheinungen gekennzeichnet, nämlich eine anfänglich rasche vegetative Vermehrung und einen nachfolgenden Verlust der grünen Farbe. Die Zuckerernährung führt schliesslich zur Einstellung der Photosynthesetätigkeit. Rufener [1,2] hat festgestellt, dass sich die Chloroplasten vergilbender Kulturen in charakteristischer Weise verändern. Es werden grosse Mengen von Stärke eingelagert, gleichzeitig verschwindet die typische Lamellarstruktur nach und nach. Die biochemischen Ursachen, welche diese morphologischen Veränderungen hervorrufen, sind nicht bekannt; es könnten jedoch Störungen des Stoffwechsels der am Aufbau der Membranen beteiligten Proteine und Lipide dafür verantwortlich sein. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, ob die Lipide vergilbender Plastiden Veränderungen zeigen, die als Ursache für den Strukturwandel in Frage kommen könnten. Typisch für die Lipide normaler Chloroplasten ist ihr hoher Gehalt an Galactolipiden [3] und an ungesättigten Fettsäuren [4]. Deshalb haben wir als erstes das Verhalten dieser Komponenten im Verlaufe des Vergilbungsprozesses untersucht.

2. Material und Methoden

Die zuckerhaltigen Kulturen von *Spirodela oligorrhiza* (Stamm Nr. 22'01'76)* wurden in 150 ml Erlenmeyerkolben auf einer von Rufener [1] modifizierten Nährlösung nach Hutner [5], welcher 1% Glucose zugesetzt wurden, gezogen, wobei die Anzucht unter Kunstlicht bei einer mittleren Temperatur von 26°C unter sterilen Bedingungen erfolgte. Normale, zuckerfreie Kulturen wurden unter genau gleichen Bedingungen ebenfalls auf der modifizierten Hutner-Nährlösung herangezogen. Die ersten Proben wurden nach 11 Tagen den noch vollständig grünen Kulturen entnommen. Weitere Proben wurden in Abständen von 4–5 Tagen untersucht, die letzte nach 25 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt sind die normalen Kulturen noch grün, die Glucose-Kulturen jedoch fast gelb.

Die Pflanzen wurden auf einer Nutsche von der Nährlösung getrennt, ausgewaschen und nach Zerkleinerung in einer Walzenmühle (Greve & Behrens, Hamburg) sofort mit Methanol und dann mit Aether erschöpfend extrahiert. Der Extrakt wurde eingedampft und der Rückstand nach vollständiger Trocknung mit Aether extrahiert. Das nach Eindampfen der Aether-

* Stammkulturen von *Spirodela oligorrhiza* wurden uns in freundlicher Weise vom Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Bern zur Verfügung gestellt.

lösung erhaltene aetherlösliche Lipid bezeichnen wir als E-Lipid.

Monogalactosyldiglycerid (MG) und Digalactosyldiglycerid (DG) wurden im wesentlichen nach Heinz [6] durch Auftrennung der Lipide auf DC-Platten isoliert und anschliessend mit Anthron photometrisch bestimmt. Eichkurven wurden mit gereinigten Galactolipiden aus *Spirodela*-Pflanzen hergestellt. Zur Unter-

Zur Untersuchung der Fettsäuren wurden Lipidproben von ca. 5 mg in Seitenarm-Kolben nach Kates [7] mit 3% HCl in trockenem Methanol umgeestert. Die Fettsäuremethylester wurden mit Petroläther ausgeschüttelt und auf einem Pye Argon Gaschromatographen (Chromosorb W mit 5% Polyäthylenglycoladipat bei 170°C) getrennt. Die für die quantitative Auswertung notwendigen Korrekturfaktoren für die einzelnen Komponenten wurden anhand entsprechender Testgemische ermittelt.

Da alle übrigen Bezugsgrößen wie Trockengewicht, Pigment- und Proteinstickstoff-Gehalt von den Ernährungsbedingungen abhängen und damit für Vergleiche nicht verlässlich sind, wurden alle Gehaltsangaben auf das E-Lipid bezogen.

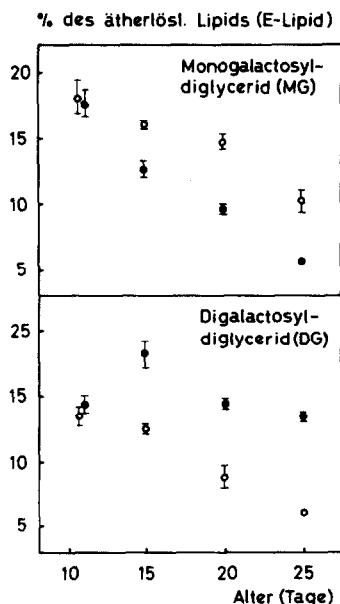


Fig. 1. Galactosyldiglyceride im ätherlöslichen Lipid von normalen (○) und glucosestimulierten (●) Kulturen von *Spirodela oligorrhiza*. Mittelwerte und deren mittlerer Fehler aus 4 Bestimmungen.

3. Resultate und Diskussion

Wie die Ergebnisse zeigen, weicht die Lipidzusammensetzung glucosestimulierter Kulturen deutlich von derjenigen normaler Kulturen ab.

Wie Fig. 1 zeigt, enthält das E-Lipid von Pflanzen, die auf normalen Nährmilieu gewachsen sind, bei Versuchsbeginn (11. Tag) durchschnittlich 18% MG. Dieser Gehalt sinkt bis zum 20. Tag auf 15% ab. In den glucosestimulierten Kulturen nimmt in der gleichen Zeitspanne der Anteil des MG von rund 18% auf 9% ab und bleibt dann annähernd konstant. Ob die im letzten Kurvenabschnitt beobachtete Inversion signifikant ist, ist zur Zeit nicht ganz sicher.

In bezug auf DG liegt der Gehalt in Normalkulturen anfänglich um 14% und sinkt bis zum 25. Tag auf 6% ab. In glucosestimulierten Pflanzen dagegen bleibt der Gehalt, abgesehen von einem vorübergehenden Anstieg, während der ganzen Versuchsdauer annähernd konstant.

Das E-Lipid glucosestimulierter Kulturen enthält somit weniger MG, aber mehr DG als dasjenige von Normalkulturen. Dies könnte bedeuten, dass während des Vergilbungsvorganges MG einen beschleunigten Abbau erfährt, während DG weitgehend erhalten bleibt. Da in den Glucose-Kulturen MG abnimmt, während DG zunimmt, wäre sogar denkbar, dass zwischen den beiden Vorgängen ein Zusammenhang besteht. Eine solche Abhängigkeit wäre zum Beispiel bei einer Neubildung von DG aus MG, wie sie von Ongun und Mudd [8] in Chloroplasten gefunden worden ist, zu erwarten. Weitere Versuche, die sich mit dieser Frage befassen, sind in Gange.

In der Zusammensetzung der Fettsäuren lassen sich ebenfalls sehr typische Unterschiede erkennen.

Fig. 2 gibt die prozentualen Anteile der $C_{16:0}$, $C_{18:2}$ - und $C_{18:3}$ -Säuren an, welche zusammen über 90% der Gesamtfettsäuren dieser Pflanzen ausmachen. In normalen Kulturen steigt der relative Gehalt der $C_{16:0}$ -Säure mit zunehmendem Alter leicht an, während der Anteil der $C_{18:3}$ -Säure in gleichem Masse abnimmt. Ähnliche Beobachtungen wurden von Newman [8] an Blättern verschiedenen Alters von Bohnen gemacht. Die Veränderungen im Fettsäuregehalt glucosestimulierter Kulturen sind dem Sinne nach dieselben, aber viel ausgeprägter. Zusätzlich erfährt hier auch die $C_{18:2}$ -Säure eine relative Zunahme. Ähnliche

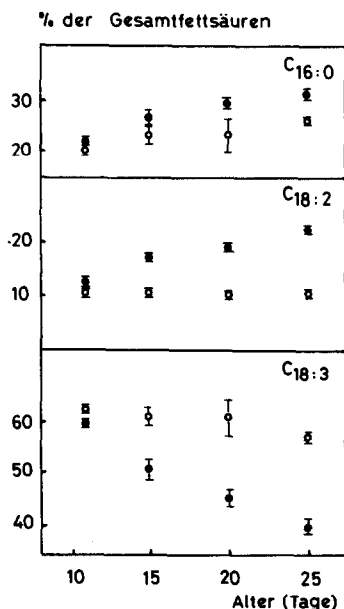


Fig. 2. Fettsäuren im ätherlöslichen Lipid von normalen (○) und glucosestimulierten (●) Kulturen von *Spirodela oligorrhiza*. Mittelwerte und deren mittlerer Fehler aus 4 Bestimmungen.

Fettsäuremuster wie in Glucose-Kulturen von *Spirodela* wurden in den Lipiden gelber Herbstblätter angetroffen [10]. Die Ursache ihrer Entstehung ist noch nicht bekannt. Nach Harris und James [11] sind grüne Pflanzenorgane imstande, die C_{18:3}-Säure durch schrittweise Olefinierung aus gesättigten Vorstufen zu synthetisieren. Wir vermuten daher, dass das in vergilbten Pflanzen angetroffene Fettsäuremuster durch eine Hemmung des letzten, zur C_{18:3}-Säure führenden Olefinierungsschrittes und eine damit verbundene Anhäufung entsprechender Vorstufen zustande kommt.

Wie diese Ergebnisse zeigen, sind mit den strukturellen Veränderungen der Chloroplasten von *Spirodela* deutliche Änderungen in der Lipidzusammensetzung verbunden, wobei die Galactosyldiglyceride und die in diesen angereicherten ungesättigten Fettsäuren besonders stark betroffen sind. Da die Galactolipide bis zu 2/3 der Chloroplastenlipide ausmachen, halten wir für wahrscheinlich, dass Änderungen in deren Zusammensetzung und Mengenverhältnis die Stabilität und

Funktionstüchtigkeit der Chloroplasten wesentlich beeinflussen und mit ein Grund für den beobachteten Strukturwandel sein könnten. Die Ursache dieser Phänomene könnte allerdings auch in einer Störung der Proteinsynthese (Enzyme) zu suchen sein. Rufener [1,12] hat festgestellt, dass in glucosestimulierten Kulturen der in der Nährlösung angebotene Stickstoff rasch aufgebraucht wird, so dass eine Neubildung von Proteinen nicht mehr gewährleistet ist. Die beobachtete Abnahme des Proteingehaltes steht im Einklang mit der elektronenoptisch sichtbaren Auflösung der lamellaren Strukturen und deren Ersatz durch Stärke. Ferner haben Mayer und Czygan [13] an Stickstoffmangel-Kulturen von Grünalgen einen Abbau des Thylakoidsystems beobachtet. Den Einfluss der Stickstoffernährung auf die Strukturänderungen in *Spirodela*-Chloroplasten zu untersuchen, ist das Ziel weiterer Arbeiten.

Die Arbeiten wurden mit Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds durchgeführt. Frl. S.Reber danken wir für die Durchführung der analytischen Arbeiten.

Literatur

- [1] J.Rufener, Diss. Bern 1966.
- [2] E.C.Grob und J.Rufener, Proceedings of the Intern. Congress of Photosynthesis Research, Freudenstadt (1968).
- [3] A.A.Benson, Ann. Rev. Plant Physiol. 15 (1964) 1.
- [4] A.T.James und B.W.Nichols, Nature 210 (1966) 372.
- [5] H.S.Hutner, in: Growth and differentiation in plants; ed. W.E.Loomis (Iowa State College Press, Iowa, 1953) p. 417.
- [6] E.Heinz, Biochim. Biophys. Acta 144 (1968) 333.
- [7] M.Kates, J. Lipid Res. 5 (1964) 132.
- [8] A.Ongun und J.B.Mudd, J. Biol. Chem. 243 (1968) 1558.
- [9] D.W.Newman, Biochem. Biophys. Res. Commun. 9 (1962) 179.
- [10] W.Eichenberger und E.C.Grob, Helv. Chim. Acta 48 (1965) 1194.
- [11] R.V.Harris und A.T.James, Biochim. Biophys. Acta 106 (1965) 456.
- [12] E.C.Grob, J.Rufener und K.H.Erismann, Planta, im Druck.
- [13] F.Mayer und F.-Ch.Czygan, Planta 86 (1969) 175.