

## ZUR CHEMOTAXONOMISCHEN BEDEUTUNG DES [<sup>14</sup>C]-MARKIERUNGSMUSTERS BEI RHODOPHYCEEN

BRUNO P. KREMER und ROSMARIE VOGL

Botanisches Institut der Universität, D-5000 Köln 41, BRD

(Received 2 July 1974)

**Key Word Index**—Rhodophyceae; photosynthetic <sup>14</sup>C-labelling pattern; photosynthates; floridoside; mannitol; distribution; taxonomy.

**Abstract**—After short term photosynthesis in  $H^{14}CO_3^-$ , the low molecular photosynthates of 63 species from 43 genera of marine Rhodophyceae have been compared. In contrast to earlier reports, it has been found that neither mannitol nor any other hexitol is <sup>14</sup>C-labelled during photosynthesis. Among the assimilates, [<sup>14</sup>C]-floridoside was found to be the most important carbohydrate. With regard to the [<sup>14</sup>C]-floridoside, there are remarkable differences in the typical labelling pattern of the soluble fraction between the members of the Ceramiales and all other species. The intense labelling of [<sup>14</sup>C]-floridoside in all species except those of the Ceramiales is of chemotaxonomic significance in the classification of the Rhodophyceae.

### EINLEITUNG

Unter den Komponenten der löslichen Fraktion gilt das aus *Rhodymenia palmata* erstmals isolierte Floridosid als besonders charakteristischer und in auffallenden Quantitäten auftretender Inhaltsstoff der Rhodophyceae [1–3]. Die Struktur dieser Verbindung konnte bald als 2-O-Glycerol- $\alpha$ -D-galactopyranosid erkannt werden [4, 5], und zahlreiche Untersuchungen zu ihrem Vorkommen wiesen die nahezu universelle Verbreitung bei den Rhodophyceen nach [6–9]. Außer diesem Floridosid wurden in der Folgezeit weitere Glycerolgalactoside bekannt [10–12], und seit den ersten biochemischen Untersuchungen der Photosynthese in Rotalgen ist gesichert, daß Floridosid bei den Rhodophyceae als schnellmarkiertes Photosyntheseprodukt auftritt [13]. Nachdem wiederum in *Rhodymenia palmata* schon sehr früh auch Polyole vom Typ des Mannitol nachgewiesen worden sein sollten [14], mehrten sich Angaben über Polyolnachweise in verschiedenen Rotalgenarten [10, 15]. Besonders nach der Einführung der [<sup>14</sup>C]-Tracertechnik in Photosyntheseversuche wurde von Rhodophyceen neben dem Auftreten von [<sup>14</sup>C]-Floridosid mehrfach auch über den

Nachweis photosynthetisch [<sup>14</sup>C]-markierten Mannitols berichtet [16–19]. Auch neueste Untersuchungen an Süßwasserrhodophyceen geben für Mannitol beträchtliche Markierungsraten an [20, 21].

Die vorliegende Arbeit berichtet über die vergleichende Analyse der [<sup>14</sup>C]-Assimilate nach Kurzzeitphotosynthese einer repräsentativen Auswahl mariner Rhodophyceenarten und über die Möglichkeit, die nach [<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>]-Photosynthese erhaltenen charakteristischen Markierungsmuster der löslichen Fraktion für die chemotaxonomische Behandlung dieser Algenklasse zu verwenden.

### ERGEBNISSE

#### Photosyntheseprodukte

Nach [<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>]-Kurzzeitphotosynthese (10 min) ließen sich in der EtOH-löslichen Fraktion chromatographisch zahlreiche [<sup>14</sup>C]-markierte Assimilate nachweisen. Darunter befanden sich Asparaginsäure, Glycin, Serin, Alanin und Glutaminsäure, 3-Phosphoglycerinsäure und  $\alpha$ -Glycerophosphat (neben weiteren Phosphatestern), sowie Citrat, Malat, Fumarat, Glycolat u.a.

Bei *Porphyra*, *Rhodymenia*, *Corallina* u.a. waren die nach chromatographischer Trennung der Assimilate (TLC oder PC) erhaltenen Kontaktautoradiogramme solchen von vergleichbaren Versuchen mit marinen Phaeophyceen [22, 23] außerordentlich ähnlich. Analog zum Mannit der Phaeophyceae wiesen sie zusätzlich zu den angeführten Substanzen eine weitere stark markierte Position auf, von der in Anlehnung an die Daten der Literatur [16, 17, 20, 24] zunächst angenommen wurde, es handele sich auch hier um einen Hexit. In einer Reihe von Trennsystemen [22, 24] waren die ermittelten  $R_f$ -Werte denen von Mannit nahezu gleich. Nach PC in  $H_2O$ -gesättigtem, ungepuffertem Phenol konnte die fragliche Substanz jedoch von authentischem Mannit abgetrennt und durch Cochromatographie mit authentischem 2-O-D-Glycerol- $\alpha$ -D-galactopyranosid als Floridosid identifiziert werden. Zudem wurden nach schonender Säurehydrolyse jeweils [ $^{14}C$ ]-Galactose und [ $^{14}C$ ]-Glycerol erhalten. [ $^{14}C$ ]-Mannit konnte in keinem Fall der hier untersuchten Rotalgen nachgewiesen werden. [ $^{14}C$ ]-Isofloridosid (1-O-D-Glycerol- $\alpha$ -D-galactopyranosid) konnte unter den beschriebenen Bedingungen ebenfalls nicht gefunden werden.

#### Markierungsverlauf einiger Assimilate

In Abb. 1 ist der Zeitverlauf der [ $^{14}C$ ]-Markierung einiger charakteristischer Assimilate von *Porphyra umbilicalis* stellvertretend für die auch an *Rhodymenia*, *Dumontia*, *Corallina* u.a. gewonnenen kinetischen Daten wiedergegeben. Die Gesamtheit der Phosphorylierungsprodukte ist nach 10 sec Photosynthese mit mehr als 80% an der [ $^{14}C$ ]-Markierung der EtOH-löslichen Fraktion beteiligt, die innerhalb der untersuchten Assimilationszeiten den weitaus überwiegenden Teil der Gesamtmarkierung ausmacht. Von diesem Betrag entfallen 72% auf die Hexosemonophosphate und auf 3-Phosphoglycerinsäure sowie 9% auf  $\alpha$ -Glycerophosphat. Nach insgesamt 10 min Photosynthese ist der prozentuale Anteil dieser Stoffgruppe auf wenig mehr als 10% des insgesamt eingelagerten  $^{14}C$  zurückgegangen. Aus dieser anfänglich sehr hohen Markierungsbeteiligung der Phosphat-ester muß geschlossen werden, daß die  $CO_2$ -Fixierung offenbar dem Weg des reduktiven Pentosephosphatcyclus folgt. Umgekehrt verhält sich die Markierungskinetik von Floridosid: von wenigen

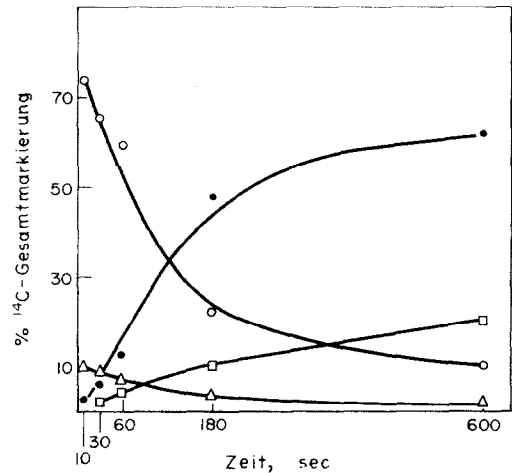


Abb. 1. *Porphyra umbilicalis*. Zeitverlauf der [ $^{14}C$ ]-Markierung einiger wichtiger Assimilate nach Kurzzeitphotosynthese.  $\circ$  = Zuckermonophosphate und 3-Phosphoglycerat;  $\bullet$  = Floridosid;  $\triangle$  =  $\alpha$ -Glycerophosphat;  $\square$  = Glycin und Serin.

Prozent nach 10 sec erhöht sich der relative Markierungsanteil sehr rasch auf mehr als 60% nach 10 min. Floridosid erweist sich somit als wichtigstes akkumuliertes Photosyntheseprodukt, dem damit offenbar zunächst Speicherfunktion zukommt. Ein ebenso rascher, im relativen Anteil jedoch geringerer Transfer photosynthetisch fixierter [ $^{14}C$ ]-Aktivität erfolgt in die beiden Aminosäuren Glycin und Serin, deren Markierungsrate nach 10 min aber immerhin mindestens 20% erreicht hat.

#### Vergleich der [ $^{14}C$ ]-Markierungsmuster

Bei der Ausdehnung der [ $^{14}CO_2$ ]-Photosyntheseversuche auf zahlreiche Rotalgenspecies möglichst verschiedener taxonomischer Zugehörigkeit und einer systematischen Analyse der erhaltenen [ $^{14}C$ ]-Markierungsmuster zeigte es sich, daß die geprüften Arten (Tabelle 1) keine uniformen Markierungsmuster liefern, sondern nach der Zusammensetzung der [ $^{14}C$ ]-Assimilate der löslichen Fraktion in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Die erste zeigt das bereits vorgestellte [ $^{14}C$ ]-Markierungsmuster, in dem als auffallendste Verbindungen Floridosid sowie die Aminosäuren Glycin und Serin auftreten (Typ A, Abb. 2a, b). Die zweite Artengruppe unterscheidet sich von den Vertretern des Typs A auffallend dadurch, daß [ $^{14}C$ ]-Floridosid trotz gleicher Versuchsbedingungen vollständig fehlt. An dieser Stelle findet sich mit geringem Markierungsanteil

Tabelle 1. Herkunft der untersuchten Algenarten und Charakteristik der [ $^{14}\text{C}$ ]-Markierungsmuster

Art	Herkunft		[ $^{14}\text{C}$ ]-Muster	
	Helgoland	Roscoff	Typ A	Typ B
<b>Bangiales</b>				
<i>Porphyra purpurea</i> (Roth) C. Ag.	+	+	+	
<i>P. umbilicalis</i> (L.) J. Ag.	+	+	+	
<b>Nemalionales</b>				
<i>Nemalion helminthoides</i> (Vell.) Batt.*		—	+	
<i>Trailiella intricata</i> Batt.	+		+	
<b>Gelidiales</b>				
<i>Gelidium latifolium</i> (Grev.) Born. et Thur.		+	+	
<i>G. sesquipedale</i> (Turn.) Thur.		+	+	
<i>G. pulchellum</i> (Turn.) Kütz.		+	+	
<b>Gigartinales</b>				
<i>Furcellaria fastigiata</i> (L.) Lamour.	+	+	+	
<i>Catenella repens</i> (Lightf.) Batt.		+	+	
<i>Calliblepharis ciliata</i> (Huds.) Kütz.		+	+	
<i>C. jubata</i> (Good. et Woodw.) Kütz.		+	+	
<i>Cystoclonium purpureum</i> (Huds.) Batt.	+	+	+	
<i>Plocamium cartilagineum</i> (L.) Dixon	+	+	+	
<i>Sphaerococcus coronopifolius</i> Stackh.		+	+	
<i>Gracilaria foliifera</i> (Forssk.) Boerg.		+	+	
<i>G. verrucosa</i> (Huds.) Papenf.		+	+	
<i>Ahnfeltia plicata</i> (Huds.) Fries	+	+	+	
<i>Gymnogongrus norvegicus</i> (Gunn.) J. Ag.	+	+	+	
<i>Phyllophora brodiaei</i> (Turn.) Endl.	+		+	
<i>P. palmettoides</i> J. Ag.		+	+	
<i>P. membranifolia</i> (Good. et Woodw.) J. Ag.		+	+	
<i>Chondrus crispus</i> Stackh.	+	+	+	
<i>Gigartina acicularis</i> (Wulf.) Lamour.		+	+	
<i>G. pistillata</i> (Gmel.) Stackh.		+	+	
<i>G. stellata</i> (Stackh.) Batt.		+	+	
<i>G. teedii</i> (Roth) Lamour.		+	+	
<b>Cryptonemiales</b>				
<i>Corallina officinalis</i> L.	+	+	+	
<i>Jania rubens</i> (L.) Lamour.		+	+	
<i>Dilsea carnosa</i> (Schmid.) Kuntze		+	+	
<i>Dumontia incrassata</i> (O. F. Mül.) Lamour.	+	+	+	
<i>Polyides rotundus</i> (Huds.) Grev.	+	+	+	
<b>Rhodymeniales</b>				
<i>Champia parvula</i> (C. Ag.) Harv.		+	+	
<i>Gastroclonium ovatum</i> (Huds.) Papenf.		+	+	
<i>Lomentaria articulata</i> (Huds.) Lyngb.		+	+	
<i>L. clavellosa</i> (Turn.) Gaill.	+		+	
<i>Rhodymenia palmata</i> (L.) Grev.		+	+	
<b>Ceramiales</b>				
<i>Antithamnion plumula</i> (Ellis) Thur.		+		+
<i>Callithamnion corymbosum</i> (Sm.) Lyngb.		+		+
<i>C. tetragonum</i> (With.) S. F. Gray		+		+
<i>Ceramium shuttleworthianum</i> (Kütz.) Silva		+		+
<i>C. rubrum</i> (Huds.) C. Ag.	+	+		+
<i>C. arborescens</i> J. Ag.		+		+
<i>Griffithsia flosculosa</i> (Ellis) Batt.		+		+
<i>Plumaria elegans</i> (Bonnem.) Schm.	+	+		+
<i>Apoglossum ruscifolium</i> (Turn.) J. Ag.		+		+
<i>Cryptopleura ramosa</i> (Huds.) Kylin		+		+
<i>Delesseria sanguinea</i> (Huds.) Lamour.	+	+		+
<i>Hypoglossum woodwardii</i> Kütz.		+		+
<i>Membranoptera alata</i> (Huds.) Stackh.	+	+		+
<i>Nitophyllum punctatum</i> (Stackh.) Grev.		+		+
<i>Phycodrys rubens</i> (L.) Batt.	+			+
<i>Heterosiphonia plumosa</i> (Ellis) Batt.		+		+
<i>Chondria dasyphylla</i> (Woodw.) C. Ag.		+		+
<i>Halopitys incurvus</i> (Huds.) Batt.		+		+

Tabelle 1 (contd)

Art	Herkunft		$[^{14}\text{C}]$ -Muster	
	Helgoland	Roscoff	Typ A	Typ B
<i>Laurencia hybrida</i> (D.C.) Lenorm.		+		+
<i>L. obtusa</i> (Huds.) Lamour.		+		+
<i>L. pinnatifida</i> (Huds.) Lamour.		+		+

\* *Nemalion helminthoides* wurde von der Algensammlung Göttingen (LB 1352-1) bezogen.

die mit  $[^{14}\text{C}]$ -Floridosid sonst partiell überlappende  $[^{14}\text{C}]$ -Glutaminsäure (Typ B, Abb. 2c, d). Alle Arten, bei denen das Markierungsmuster des

Typs B aufgefunden wurde, gehören ausnahmslos der Ordnung der Ceramiales an (Tabelle 1), während das Assimilatmuster des Typs A ohne

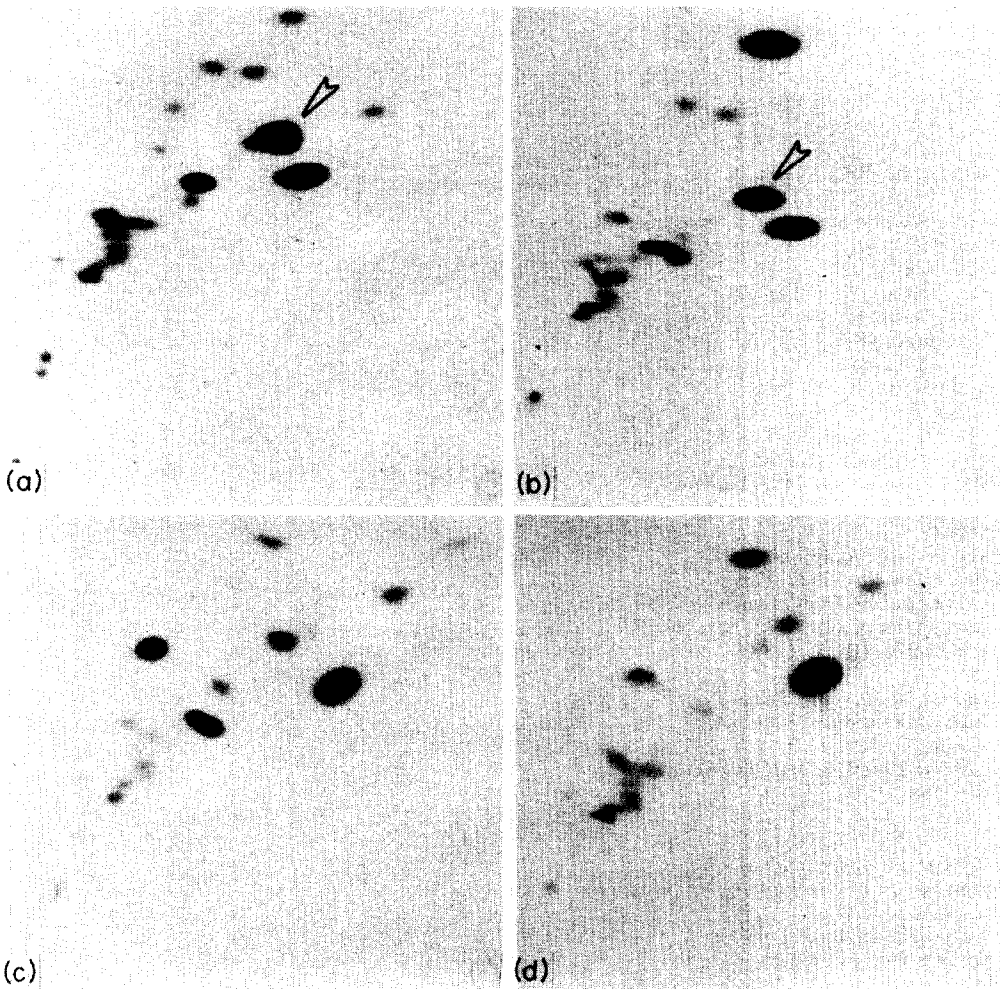


Abb. 2. TLC-Autoradiogramme der EtOH-löslichen Fraktion nach 10 min Photosynthese: Unterschiede im  $[^{14}\text{C}]$ -Markierungsmuster zwischen Ceramiales und den übrigen Rotalgenvertretern. Typ A: a = *Gelidium pulchellum*; b = *Polyides rotundus*. Typ B: c = *Delesseria sanguinea*; d = *Callithamnion corymbosum*. Der Pfeil weist auf die Position von  $[^{14}\text{C}]$ -Floridosid. Zur Identifizierung der Assimilate und ihrer Position auf den Autoradiogrammen vgl. Refs. [13, 20, 22–24].

weitere Differenzierbarkeit bei den übrigen Ordnungen der Florideophycidae und Bangiophycidae vorkommt.

#### DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen der niedermolekularen, schnellmarkierten Photosyntheseprodukte mariner Rotalgen zeigen, daß freie Polyole wie etwa Mannit als akkumulierende Assimilate nicht auftreten. Entsprechende Angaben von teilweise vergleichbaren Untersuchungen an marinen oder an Süßwasser-Rhodophyceen [16, 17, 19–21] sollten daher überprüft werden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von *Iridophycus* [13, 25] ist bei den meisten untersuchten Arten [ $^{14}\text{C}$ ]-Floridosid das einzige Kohlenhydrat der löslichen Fraktion mit der charakteristischen, steilen Markierungskinetik der akkumulierten Photosynthate. Freie Zucker oder Oligosaccharide wie die offenbar für Süßwasserarten charakteristische Trehalose [9, 20, 21] fehlen überhaupt.

[ $^{14}\text{C}$ ]-Floridosid konnte ähnlich wie in früheren Versuchen mit *Ceramium*, *Phycodrys* und *Polysiphonia* [17] in keiner der den Ceramiales zugerechneten Arten nachgewiesen werden. Diese signifikante Unterscheidbarkeit der Arten nur einer Ordnung kann in den hier vorgestellten Versuchen nicht mit Veränderungen des Versuchsmediums erklärt werden [25]. Andererseits erscheint es auch ungewöhnlich, daß die Ceramiales offenbar keinen  $\text{C}_6$ -Körper als Assimilat der löslichen Fraktion aufweisen.

Die analysierten Positionen von [ $^{14}\text{C}$ ]-Floridosid verhielten sich chromatographisch einheitlich—[ $^{14}\text{C}$ ]-Isofloridosid oder [ $^{14}\text{C}$ ]-Digeneasid (= Glycerinsäuremannosid) konnten nicht nachgewiesen werden. Insoweit ergeben sich wenig Vergleichsmöglichkeiten mit den Ergebnissen der ersten systematischen Inhaltsstoffuntersuchungen an Rotalgen [8, 9, 26], die ohnehin ein recht uneinheitliches Bild lieferten.

Auf der Grundlage der hier vorgestellten Ergebnisse kann die bereits vorläufig vorgenommene Einteilung der Rhodophyceae nach chemischen Gesichtspunkten [3, 27] nicht aufrechterhalten bleiben. Die chemotaxonomische Behandlung dieser Algenklasse sollte nicht weiter nur auf das spurenweise Vorkommen von Mannit oder anderen Polyolen gegründet werden, sondern

mußte in erster Linie die photosynthetischen Akkumulationsprodukte und damit physiologische Prozesse berücksichtigen.

#### EXPERIMENTELLES

**Algenmaterial.** Die in Tabelle 1 aufgeführten Algenarten wurden in verschiedenen Monaten 1972 und 1973 auf dem Felswatt von Helgoland sowie im März 1973 und 1974 an der bretonischen Küste in der Umgebung von Roscoff vom natürlichen Standort entnommen und unmittelbar für die Einzelversuche verwendet. *Nemalion helminthoides* wurde von der Algensammlung Göttingen (LB 1352-1) bezogen.

**Inkubation.** Nach 15 min Vorbelichtung zur Einstellung des "steady state" wurden die Thallusstücke (1–3 g Frischgewicht) für 10–600 sec in einem [ $^{14}\text{C}$ ]-Seewassermedium (0.5–1 mCi  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ , spez. Aktivität 60 mCi/mmol, in 10–20 ml membrangefiltertem Seewasser) von jeweils Standorttemperatur bei  $1.5\text{--}2 \times 10^4 \text{ lx}$  Beleuchtungsstärke inkubiert. Die Fixierung erfolgte in heißem 80% EtOH.

**Analytik.** Nach erschöpfender Extraktion der Thalli (80%, 50% EtOH) und szintillationsspektrometrischer Messung der eingebauten [ $^{14}\text{C}$ ]-Aktivität wurden Aliquote der erhaltenen Extrakte nach Feige *et al.* [24] mittels TLC aufgetrennt. Die Verteilung der [ $^{14}\text{C}$ ]-Aktivität auf die Einzelsubstanzen wurde durch direktes Ausmessen der kontaktautoradiographisch ermittelten Positionen mit einem Methandurchflußzählrohr (LB 520 mit FHT 650 B1) oder szintillationsspektrometrisch bestimmt. Die Identifizierung der Assimilate erfolgte durch wiederholte Cochromatographie mit authentischem Material in den Systemen von Bean *et al.* [13], Feige *et al.* [24], Rees *et al.* [28] oder wie früher angegeben [22]. Die Glycerolgalactoside wurden mit dem Sprühreagens nach Gordon *et al.* [29] nachgewiesen.

**Anerkennungen.**—Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft. Herrn Prof. Dr. B. Lindberg, Stockholm, danken wir für die bereitwillig überlassenen Proben authentischen Floridosids und Isofloridosids.

#### LITERATUR

- Colin, H. und Guéguen, E. (1930) *C.R. Acad. Sci. Paris* **190**, 653.
- Colin, H. und Guéguen, E. (1930) *C.R. Acad. Sci. Paris* **191**, 163.
- Hegnauer, R. (1962) *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Vol. 1, pp. 62–92, Birkhäuser Verlag, Basel/Stuttgart.
- Colin, H. (1937) *Bull. Soc. Chim. France* **4**, 277.
- Putman, E. W. und Hassid, W. Z. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 2221.
- Colin, H. und Guéguen, E. (1933) *C.R. Acad. Sci. Paris* **197**, 1688.
- Kylin, H. (1943) *Kungl. Fysiogr. Sällsk. Lund Förh.* **13**, 51.
- Augier, J. (1947) *C.R. Acad. Sci. Paris* **224**, 1654.
- Augier, J. und Du Mérac, M. L. (1954) *C.R. Acad. Sci. Paris* **238**, 387.
- Lindberg, B. (1955) *Acta Chem. Scand.* **9**, 1093.
- Wickberg, B. (1958) *Acta Chem. Scand.* **12**, 1183.
- Wickberg, B. (1958) *Acta Chem. Scand.* **12**, 1187.
- Bean, R. C. und Hassid, W. Z. (1955) *J. Biol. Chem.* **212**, 411.
- Stenhouse, J. (1844) *Ann. Chem. Pharm.* **51**, 349.
- Lindberg, B. (1955) *Acta Chem. Scand.* **9**, 1097.
- Bidwell, R. G. S. (1958) *Can. J. Botany* **36**, 337.

17. Majak, W., Craigie, J. S. und MacLachlan, J. (1966) *Can. J. Botany* **44**, 541.
18. Craigie, J. S., MacLachlan, J. und Tocher, R. D. (1967) *Can. J. Botany* **46**, 605.
19. Whyte, J. N. C. und Southcott, B. A. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1159.
20. Feige, G. B. (1970) *Z. Pflanzenphysiol.* **63**, 288.
21. Feige, G. B. (1973) *Z. Pflanzenphysiol.* **69**, 290.
22. Kremer, B. P. und Willenbrink, J. (1972) *Planta* **103**, 55.
23. Kremer, B. P. (1973) *Mar. Biol.* **22**, 31.
24. Feige, G. B., Gimmler, H., Jäschke, W. D. und Simonis, W. (1969) *J. Chromatogr.* **41**, 80.
25. Kauss, H. (1968) *Z. Pflanzenphysiol.* **58**, 428.
26. Augier, H. (1953) *Rev. Gén. Botan.* **60**, 257.
27. Lindberg, B. (1956) *Proc. Second Intl. Seaweed Symp. Trondheim* (Braarud, T. und Sørensen, N. A., Eds.), pp. 33-39, Pergamon Press, London/New York.
28. Rees, W. R. und Reynolds, T. (1958) *Nature* **181**, 763.
29. Gordon, H. T., Thornburg, W. und Werum, L. N. (1956) *Anal. Chem.* **28**, 849.