

Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse
Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft
Band: 63 (1953)

Artikel: Papierchromatographische Untersuchungen über die pflanzliche Zuckersekretion
Autor: Zimmermann, Martin
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-44376>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 22.02.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Papierchromatographische Untersuchungen über die pflanzliche Zuckersekretion

Von Martin Zimmermann

(Aus dem Institut für Allgemeine Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich)

Eingegangen am 14. Juli 1953

| Inhaltsverzeichnis | Seite |
|---|-------|
| I. Vorwort | 402 |
| II. Methodik | 403 |
| 1. Die papierchromatographische Trennung | 403 |
| 2. Entwicklung der Chromatogramme | 404 |
| 3. Quantitative Auswertung | 405 |
| III. Über die physiologische Herkunft des Pflanzennektars | 406 |
| 1. Einleitung | 406 |
| 2. Versuche mit <i>Euphorbia pulcherrima</i> | 408 |
| a) Dochtversuche | 408 |
| b) Einstellen von Scheinblüten in Zuckerlösungen | 410 |
| c) Sekretion abgeschnittener Nektarien auf Zuckerlösungen | 410 |
| 3. Versuche mit <i>Impatiens Holstii</i> | 411 |
| a) Dochtversuche | 411 |
| b) Einstellen von Trieben in Zuckerlösungen | 413 |
| c) Nektarien auf Zuckerlösungen | 414 |
| IV. Die Oligosaccharide des <i>Impatiens</i> -Nektars | 414 |
| 1. Hydrolyse | 414 |
| 2. Enzymatische Synthese in vitro | 418 |
| 3. Über die gruppenübertragende Wirkung saccharosespaltender Enzyme | 420 |
| 4. Die Transfructosidase des <i>Impatiens</i> -Nektars | 424 |
| V. Zusammenfassung | 426 |
| VI. Literatur | 427 |

I. Vorwort

Schon seit einigen Jahrzehnten ist bekannt, daß Gemische komplizierter Verbindungen mit Hilfe von Filterpapier getrennt werden können, doch ist die Papierchromatographie, wie wir sie heute kennen, sehr jung. Bahnbrechend war die Arbeit von *Consdén, Gordon und Martin* (1944). In dieser Veröffentlichung wurde eine Methode zur zweidimensionalen Trennung von Aminosäuregemischen (Proteinhydrolysaten) auf Filterpapier beschrieben. Es zeigte sich sehr bald, daß auf diese Weise nicht nur Aminosäuren, sondern auch Zucker (*Partridge*, 1946) und die verschiedensten andern Stoffe getrennt

werden können, und heute sind die Anwendungsmöglichkeiten sozusagen unbeschränkt.

Damit bot sich nun dem Physiologen die Möglichkeit, bisher unzugängliche Gebiete zu bearbeiten und alte Probleme von einer ganz andern Seite her anzugreifen. Die vorliegende Arbeit befaßt sich einerseits mit der physiologischen Herkunft des pflanzlichen Nektars und andererseits mit dem Auftreten einer Reihe fructosehaltiger Oligosaccharide im Nektar. Sie wurde auf Anregung und unter der Leitung von Prof. Dr. A. Frey-Wyssling im Institut für Allgemeine Botanik der ETH durchgeführt.

II. Methodik

1. Die papierchromatographische Trennung

Jeder Stoff hat für ein bestimmtes Papier (in unserem Fall wurde durchwegs Whatman Nr. 1 verwendet) und eine bestimmte Trennlösung einen gegebenen R_F -Wert¹, der allerdings nicht so konstant ist, wie man vielleicht annehmen möchte. Temperatur, Konzentration, geringe Inhomogenitäten des Papiers, Fremdionen und Verunreinigungen des Lösungsmittels verursachen unter Umständen Schwankungen bis zu 10 % (Cramer, 1952). Es wurde deshalb mit wenigen Ausnahmen eindimensional chromatographiert, damit bekannte Vergleichsubstanzen mitlaufen gelassen werden konnten.

Als Trennlösung wurde in den meisten Fällen *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (4 : 1 : 5) verwendet (Partridge und Westhall, 1948).

Da es vorkommen kann, daß zwei Zucker gleiche oder sehr ähnliche R_F -Werte haben, d. h. nicht oder nur mangelhaft getrennt werden, ist es ratsam, Kontrollen mit einer zweiten, von der ersten möglichst verschiedenen Trennlösung durchzuführen. Zu diesem Zwecke wurde Phenol verwendet, das aber erst nach gründlicher Reinigung brauchbar ist. Die käufliche 85—90prozentige Phenollösung wird bei Normaldruck über 0,1 % Al-Drehspänen und 0,05 % NaHCO_3 so lange destilliert, bis das Wasser übergegangen ist; dann wird bei 25 mm Hg bis zum fast schwarzen Rückstand weiter destilliert (Draper et al., 1949). Es ist allerdings zu beachten, daß das reine Phenol schon bei Zimmertemperatur fest ist, d. h. am Schluß der Destillation den Kühler verstopfen kann. Man verwendet deshalb entweder einen Wurstkolben, oder man gibt durch einen Tropftrichter im kritischen Moment jedesmal einen Tropfen Wasser zu, der sofort verdampft und das Phenol im Kühler verflüssigt.

¹ Der R_F -Wert ist das Maß für die Wanderungsgeschwindigkeit eines Stoffes und ist definiert als Quotient aus der Entfernung der Substanz vom Ausgangspunkt durch die Entfernung der Trennlösungsfront vom Ausgangspunkt (engl.: «Ratio» bezogen auf die «Front»).

Die dritte, viel verwendete Trennlösung hat den Vorteil, daß Glucose und Fructose sehr gut getrennt werden. Sie kam immer dort zur Anwendung, wo Glucose und Fructose nebeneinander quantitativ bestimmt werden mußten. Zu ihrer Herstellung werden 600 ml *n*-Butanol, 50 ml Ameisensäure (90 %) und 50 ml Wasser eine Stunde unter dem Rückflußkühler gekocht, dann werden weitere 300 ml Wasser zugegeben und während der Abkühlung von Zeit zu Zeit geschüttelt. Nach zirka 24 Stunden wird die wässrige Phase abgetrennt (Wiggins und Williams, 1952).

Für alle Arbeiten wurden Apparaturen der Firma A. Dumas, Zürich, verwendet, die ganz aus Glas konstruiert sind und sich ausgezeichnet bewährt haben.

2. Entwicklung der Chromatogramme

Die ersten Zuckerchromatogramme von Partridge (1946) wurden mit ammoniakalischem Silbernitrat entwickelt. In der Literatur erschienen in den darauffolgenden Jahren sehr viele weitere Vorschläge, meistens handelte es sich um bereits bekannte, aber speziell für die Papierchromatographie ausgearbeitete Reaktionen. Für die vorliegende Arbeit wurden in der Hauptsache vier Entwicklungsmittel verwendet:

Anilinoxalat (Partridge, 1951)

0,93 g Anilin in Äthylalkohol (50 ml) werden mit der gleichen Menge einer 0,2 molaren, wässrigen Oxalsäurelösung gemischt. Die Chromatogramme werden nach dem Besprühen während 10 Minuten bei 110° C getrocknet. Hexosen und Oligosaccharide erscheinen braun, Ketosen reagieren etwas schwächer. Aldopentosen sind durch ihre leuchtend rote Farbe sofort zu erkennen. Der Hintergrund ist zuerst fast farblos, dunkelt aber im Lauf einiger Tage etwas nach.

Dieses Entwicklungsmittel wurde am meisten verwendet, besonders aber dort, wo es galt, Pentosen neben Hexosen nachzuweisen.

Anilinphthalat (Partridge, 1949)

1,66 g Phthalsäure und 0,93 g Anilin werden in 100 ml wassergesättigtem *n*-Butanol aufgelöst. Nach dem Besprühen mit dieser Lösung werden die Chromatogramme für 5 Minuten auf 105° C erwärmt. Aldohexosen reagieren olivbraun, Ketosen und Oligosaccharide werden weniger gut erfaßt, zeigen aber wie die Aldosen gelbe Fluoreszenz. Aldopentosen ergeben rotbraune Flecke mit roter Fluoreszenz. Auch hier dunkelt der vorerst fast farblose Hintergrund mit der Zeit etwas nach.

Die Methode ist besonders für den Nachweis von Aldosen brauchbar und zeichnet sich durch ihre große Empfindlichkeit aus (1 γ).

Napththoresorcin-Trichloressigsäure (Partridge und Westhall, 1948)

Eine 0,2prozentige alkoholische Napththoresorcinlösung wird vor Gebrauch mit der gleichen Menge 2prozentiger wässriger Trichloressigsäure gemischt. Man besprüht und trocknet bei 100° C. Ketosen und ketosehaltige Oligosaccharide (die während der Trocknung durch die Anwesenheit der Säure natürlich gespalten werden) reagieren leuchtend rot. Behandelt man anschließend bei 70° C mit Wasserdampf, so werden Pentosen und Uronsäuren als blaue Flecke sichtbar. Der Hintergrund ist schwach rosa gefärbt. Die Chromatogramme haben aber nur beschränkte Haltbarkeit.

Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) (Wallenfels, 1950)

Das getrocknete Chromatogramm wird mit einem frisch bereiteten Gemisch einer 2prozentigen wässrigen TTC-Lösung und 1*n* Natronlauge (1 : 1) besprüht und während 20 Minuten bei 40° C in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre gehalten. Dann wird das überschüssige TTC mit Wasser sorgfältig ausgewaschen und die Chromatogramme bei Zimmertemperatur getrocknet. An denjenigen Stellen des Chromatogrammes, wo reduzierende Zucker sind, wird das TTC in das tiefrote Formazan umgewandelt. Wenn nicht höher und nicht länger erwärmt wird, bleibt der Hintergrund weiß. Im Gegensatz zu den drei übrigen Entwicklungsmethoden ist die Farbreaktion hier nicht typisch für die einzelnen Zuckerarten, d. h. der entstandene Farbstoff ist nicht eine zuckerhaltige Komplexverbindung, sondern nur das rote Reduktionsprodukt des farblosen Entwicklungsmittels. Es reagieren demnach alle reduzierenden Stoffe mit derselben Farbe.

3. Quantitative Auswertung

Quantitative Vorversuche wurden meist mit der Planimetermethode durchgeführt (Fisher et al., 1948). Die entwickelten, ursprünglich für qualitative Zwecke bestimmten Chromatogramme können nachträglich mit zirka 10 % Genauigkeit quantitativ ausgewertet werden. Die Flecke werden im durchfallenden Licht mit dem Bleistift umrandet und anschließend planimetriert. Mit Hilfe von Eichkurven lassen sich auf diese Weise die relativen Zuckermengen bestimmen. Am besten eignen sich Chromatogramme, die mit einem Entwicklungsmittel behandelt wurden, das mit Hexosen und Aldosen möglichst gleich stark reagiert, zum Beispiel Anilinoxalat.

Auch die mit Triphenyltetrazoliumchlorid entwickelten Chromatogramme wurden hie und da zur quantitativen Auswertung benützt. Das rote Formazan kann mit salzsaurem Pyridin aus dem Filterpapier ausgewaschen und anschließend kolorimetriert werden (Wallenfels, 1950).

Die genauen Bestimmungen wurden mit dem Kupferreagens von S o m o g y i (1945) in Verbindung mit dem Farbentwickler von N e l s o n (1944) durchgeführt. Das fertige, aber noch unentwickelte Chromatogramm wird in einzelne Längsstreifen geschnitten, und zwar so, daß auf jedem Streifen ein Startpunkt und die dazugehörigen Zucker liegen. Jeder zweite Streifen, der die Kontrollzucker enthalten soll, wird entwickelt. Auf diese Weise kann die Lage der zu bestimmenden Zucker auf den unentwickelten Streifen festgelegt, und die entsprechenden Zonen ausgeschnitten werden. Das Auswaschen erfolgte bei Zimmertemperatur mit 5 cm³ Wasser während zirka einer Stunde. Die kolorimetrischen Messungen wurden mit dem Pulfrich-Photometer von Zeiß durchgeführt, und zwar in den Wellenlängen von 4940, 5300, 5500 und 5720 Å. In kurzwelligerem Licht fallen die Eichkurven für kleine Konzentrationen und steigen für große, sind also unbrauchbar; in langwelligerem ist die Absorption für höhere Konzentrationen so groß, daß die Messung unmöglich wird.

III. Über die physiologische Herkunft des Pflanzennektars

1. Einleitung

Das Problem der Deutung der pflanzlichen Zuckersekretion ist schon recht alt. Besonders aber bereitete die Bedeutung der extrafloralen Nektarien den Botanikern recht lange Schwierigkeiten. Im Verlauf des letzten Jahrhunderts entstanden drei verschiedene Theorien, die auf mehr oder weniger glückliche Art den biologischen Zweck dieser Drüsen zu erklären versuchten. Die hartnäckigste von diesen dreien, die sogenannte Ameisenschutztheorie, wurde erst 1907 durch die ausführlichen Arbeiten von N i e u w e n h u i s - v. U e x k ü l l widerlegt. Fast ebenso alt wie die biologische Erklärungsweise ist der Versuch einer physiologischen Deutung von L i e b i g (1846), der annahm, daß eine Ausscheidung von Kohlehydraten dann erfolge, wenn sie gegenüber dem verfügbaren Stickstoff der Pflanze in zu großer Menge vorhanden seien, eine Ansicht, die heute noch vertreten wird. B o n n i e r (1879) hat dann später seine recht unglückliche Zuckerreservoir-Hypothese aufgestellt, die sich aber nicht halten konnte.

Erst W o l f f (1924) kam der richtigen physiologischen Erklärung der Nektarsekretion auf die Spur, indem er sagte, daß die floralen Nektarien die überschüssigen Nährstoffe während des starken Zustroms von Assimilaten zur Zeit der Blütenentfaltung auszuschcheiden haben. F r e y - W y s s l i n g (1933) konnte anhand seiner Untersuchungen an *Hevea brasiliensis* zeigen, daß auch bei extrafloralen Nektarien die Sekretion durch eine Stauung des Assimilationsstromes zustande kommen muß, da sie immer mit dem Wachstumsabschluß des entsprechenden Organs zusammenfällt. Dies konnte auch aus der bereits vorhan-

denen Literatur herausgelesen werden. Gerade bei den extrafloralen Nektarien, die zuerst so viel Schwierigkeiten boten, läßt sich das sehr schön zeigen, und wer schon einmal Gelegenheit gehabt hat, die Entfaltung der Blätter einer hochtropischen Pflanze wie *Hevea* zu beobachten, der wird von der Richtigkeit der Saftventiltheorie überzeugt sein.

Es mußte nun allerdings noch bewiesen werden, daß der Nektar ausgedehnter Phloemsaft ist. Der anatomische Teil dieser Aufgabe wurde bereits gelöst (A g t h e, 1951; F r e i, 1952). Es wurde gezeigt, daß die Versorgung der Nektarien von Pflanzen, die konzentrierten Zuckersaft (50—60 %) ausscheiden, ausschließlich durch Phloem, von solchen mit relativ dünnflüssigem, durch Phloem und Xylem erfolgt. Physiologische Untersuchungen von C z a r n o w s k i (1952) zeigten, daß die floralen Nektarien hauptsächlich durch die assimilierenden Organe der näheren Umgebung versorgt werden. Die Wasserzufuhr erfolgt teilweise durch das Xylem, das von der Pflanze aufgenommene Wasser wird aber zunächst für die Transpiration und erst in zweiter Linie für die Nektarausscheidung verwandt. A g t h e hat das Problem auch physiologisch behandelt. Ausgehend von den Beobachtungen S c h u m a c h e r s (1933, 1937) und S t r u g g e r s (1938) über die Wanderung von Fluoreszenzfarbstoffen in den Siebröhren, versuchte er, Kaliumfluoreszein oder Berberinsulfat ins Phloem hineinzubringen und auf diese Weise die Zufuhr von Assimilaten zu sezernierenden Nektarien festzustellen. Am besten ließen sich die Fluoreszenzfarbstoffe mit Hilfe der Dochtmethode von R o u s c h a l (1941) ins Phloem einführen. Im obersten Drittel des Stengels wird die Epidermis mit einem Messer ringsherum etwa $\frac{1}{2}$ cm breit abgeschabt. Ein mit Farbstoff getränkter Wattebausch wird um die Wundstelle gelegt. Sein freies Ende taucht in ein Glasröhrchen mit der Farbstofflösung. Auf diese Weise diffundiert der Farbstoff in das angrenzende Parenchym, und von dort gelangt er in die Siebröhren. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Gewebe zeigten, daß er im Phloem zu sezernierenden Nektarien hin wandert und dort bis zum Sekretionsgewebe vordringt. Zu einer Ausscheidung des Farbstoffes mit dem Nektar kam es aber nie, weil er im Plasma der Gewebe gespeichert wird. A g t h e verwendete Konzentrationen von der Größenordnung 0,5 %. Versuchte er durch eine Erhöhung der Konzentration die Farbstoffausscheidung zu erreichen, so traten Vergiftungserscheinungen auf, und damit setzte die Sekretion aus.

Da mit Hilfe der Papierchromatographie schon sehr kleine Mengen eines Zuckergemisches in seine Komponenten aufgeteilt werden können, war es naheliegend, diese Art von Versuchen wieder aufzugreifen und statt Farbstoffen Zucker zu verwenden, denn es war anzunehmen, daß eine Zuckerinjektion der Pflanze viel weniger schädlich ist. Dies hat sich dann auch bestätigt.

Es wurden noch andere experimentelle Untersuchungen durchgeführt, die über die physiologische Herkunft des Nektars sehr deutlich Aufschluß gaben.

Als Versuchspflanzen dienten hauptsächlich *Euphorbia pulcherrima* und *Impatiens Holstii*.

2. Versuche mit *Euphorbia pulcherrima*

a) Dochtversuche

Abbildung 1 zeigt die schematische Anordnung der Blütenstände von *Euphorbia pulcherrima*. Die kleinen Kreise bezeichnen die einzelnen Cyathien. Zuerst kommt der mittlere Blütenstand zur Entfaltung, er trägt aber meistens kein Nektarium. In Abständen von je einer Woche

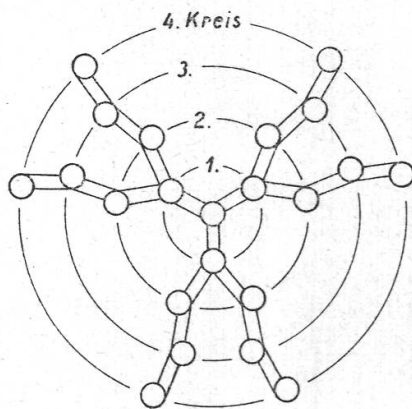


Abbildung 1
Anordnung der Blüten-
stände von *Euphorbia*
pulcherrima

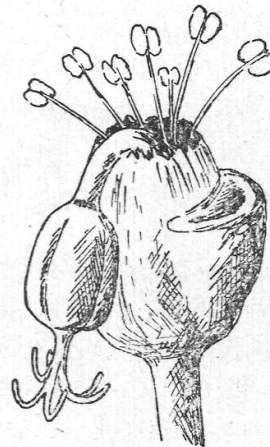


Abbildung 2
Einzelner Blütenstand

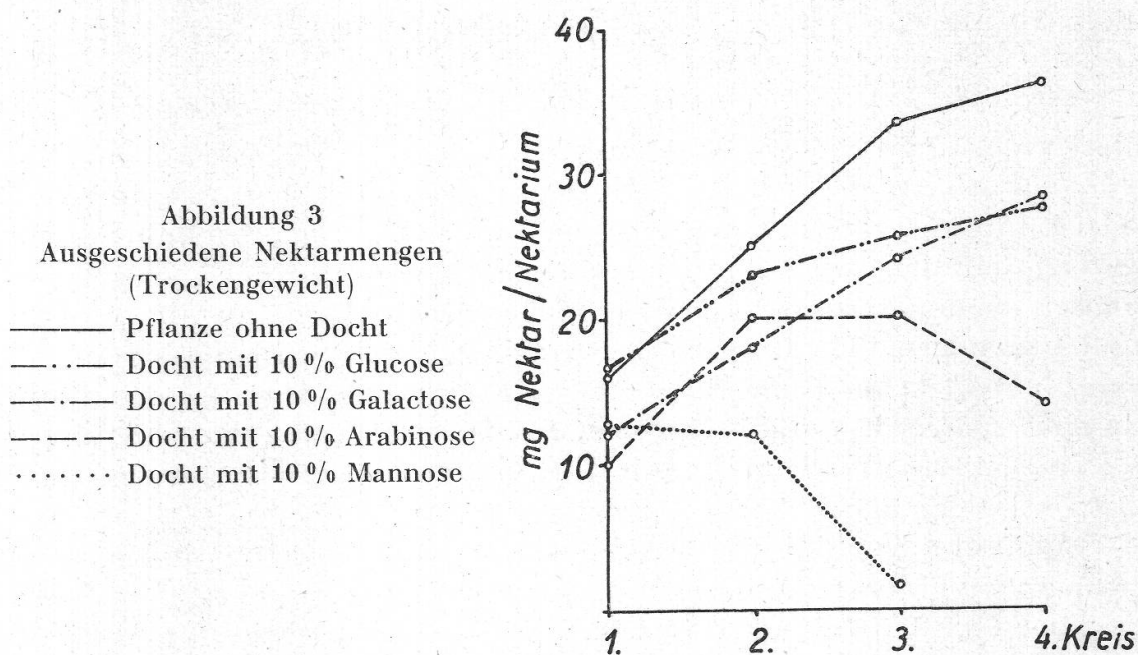
öffnen sich diejenigen der äußeren (oberen) Kreise. Der erste Kreis enthält drei, die äußeren je sechs Blütenstände. In selteneren Fällen kommt auch noch ein fünfter Kreis zum Blühen.

Die Nektarsekretion ist sehr reichlich, handelt es sich doch um eine ornithophile Pflanze, die von Kolibris befliegen wird. Während der Blütezeit scheidet ein einzelnes Nektarium die beträchtliche Menge von durchschnittlich 30 mg Zucker aus (Trockengewicht). Der Nektar besteht aus einem Gemisch von Glucose, Fructose und Saccharose.

Es wurden Dochtversuche durchgeführt, und zwar in ganz analoger Weise wie diejenigen von Agthe mit Fluoreszenzfarbstoffen. Die Überlegung war folgende: Führt man einen fremden Zucker ins Phloem ein, so sollte es möglich sein, diesen im Nektar nachzuweisen, falls die sezernierenden Nektarien durch den Assimilationsstrom versorgt werden. Es muß natürlich ein Zucker zur Verwendung kommen, der im

Nektar eindeutig als der experimentell eingeführte erkannt werden kann. Am besten eignen sich die Pentosen für diesen Zweck, denn ihr R_F -Wert ist größer als derjenige der Hexosen und Oligosaccharide, ihre rote Farbreaktion bei der Anilinoxalat-Entwicklung ist sehr empfindlich und zugleich von der Hexosenreaktion leicht zu unterscheiden. Die Versuche wurden mit 10prozentiger Arabinoselösung durchgeführt. Sie verliefen durchwegs positiv, d. h. die Arabinose konnte im Nektar eindeutig, wenn auch nur in kleiner Menge, nachgewiesen werden.

Von Interesse war natürlich auch die Wirkung, die solche Dochtversuche auf die Pflanze ausüben. Wir versuchten, hiervon durch die



Messung der ausgeschiedenen Zuckermengen ein Bild zu bekommen. Sammelt man allen Nektar, der im Laufe der Wochen von den Nektarien der einzelnen Kreise sezerniert wird, so macht man die Feststellung, daß bei Pflanzen ohne Docht die ausgeschiedene Nektarmenge (Trockengewicht) pro Nektarium nach außen hin ständig zunimmt (Abbildung 3). Die äußersten Nektarien scheiden etwa doppelt so viel aus wie die innersten. Gleiche Messungen an Pflanzen mit Glucose- oder Galactosedochten zeigten gegenüber den Kontrollversuchen kaum einen Unterschied im Sekretionsverlauf. Bei Arabinose ändert sich das Bild aber vollständig. Die Vitalität der Pflanze nimmt nach 1—2 Wochen ab, die Blätter werden abgestoßen, die Sekretion vermindert. Mit Mannose ist die Erscheinung noch deutlicher. Schon nach wenigen Tagen stellen sich die Vergiftungserscheinungen ein, die Blütenstände der äußersten Kreise kommen gar nicht mehr zur Entfaltung.

Zuletzt soll noch eine Beobachtung erwähnt werden, die schwierig zu deuten ist. Chromatographiert man den Milchsafteiner normalen Pflanze, so findet man keinen Zucker. Bei Pflanzen mit Arabinosedochten treten aber ganz beträchtliche Mengen von Arabinose im Milchsafte auf. An sich wäre das allerdings nichts Besonderes, denn beim Montieren des Dochtes wird die Epidermis weggeschabt und dadurch auch das Milchröhrensystem freigelegt. Die Zuckerlösung steht auf diese Weise mit dem Milchsafte direkt in Verbindung. Merkwürdig daran ist jedoch, daß bei den Versuchen mit Mannose, Galactose und Glucose diese Zucker im Milchsafte nicht zu finden sind. Man kann sich vorstellen, daß die Hexosen in den Stoffwechsel der Pflanzen einbezogen, d. h. vom Phloem aufgenommen werden, während die Arabinose als Ballaststoff zum Teil ins Milchröhrensystem gelangt.

b) Einstellen von Scheinblüten in Zuckerlösungen

Nach Frey - Wyssling und Agthe (1950) gehört *Euphorbia pulcherrima* zu denjenigen Pflanzen, deren Nektarien ausschließlich durch Phloem versorgt werden. Im vorhergehenden Abschnitt wurde gezeigt, daß die Verbindung vom Phloem zum Nektarium auch physiologisch nachgewiesen werden kann. Die Frage kann nun umgekehrt und folgendermaßen formuliert werden: Nach dem anatomischen Befund besteht keine Verbindung zwischen Xylem und Nektarium. Kann dies physiologisch bestätigt werden? Die Versorgung des Wasserleitungssystems mit einer Pentoselösung dürfte somit keine Pentosesekretion zur Folge haben.

Während der Blütezeit wurden Triebe von *Euphorbia pulcherrima* zirka 15 cm unter der Scheinblüte abgeschnitten. Die untersten 6—8 cm des abgeschnittenen Stengels wurden von den Blättern befreit und durch sorgfältiges Loslösen der Rinde etwa 4 cm des Holzkörpers freigelegt. Die Triebe kamen nun in eine 2,5prozentige Arabinoselösung, aber so, daß nur das Xylem in die Flüssigkeit tauchte.

Eine Serie solcher Triebe wurde während mehrerer Wochen auf die Zusammensetzung des Nektars geprüft. Es trat nie Arabinose auf.

Zur Kontrolle diente eine zweite, zur gleichen Zeit angesetzte Serie. Die Rinde dieser Triebe wurde nicht abgelöst, die Epidermis aber zuunterst abgeschabt, damit die Arabinose leichter ins Phloem diffundieren konnte. Auch hier kam eine 2,5prozentige Arabinoselösung zur Verwendung. Schon nach wenigen Tagen erschien die Arabinose im Nektar.

c) Sekretion abgeschnittener Nektarien auf Zuckerlösungen

Bevor die Pflanze zur Blüte gelangt sind die Nektarien noch klein und grün, dann werden sie größer, die Nektargrube öffnet sich, und die Sekretion beginnt. Nach und nach entfalten sich die Blüten, das Nektarium ist gelb geworden und erreicht den Höhepunkt der Sekretion.

Im Moment, wo die Sekretion beginnt, werden die Nektarien mit einem Rasiermesser unter dem Sekretionsgewebe abgeschnitten und auf 5- oder 10prozentige Zuckerlösungen gelegt. Es zeigt sich, daß die Sekretion je nach der verwendeten Zuckerart bis zu 10 Tagen weitergeht.

Auf Maltose, Lactose, Mannose, Galactose, Sorbose und Arabinose wird nach kurzer Zeit der Vorlagezucker neben dem normalen Nektar ausgeschieden. Auf Arabinoselösung schwimmend, sezernieren die Nektarien sogar so lange, bis reine Arabinose erscheint. Auf Galacturonsäure sezernieren sie nur ganz kurz und sterben dann ab, es kann aber Galacturonsäure nachgewiesen werden im Nektar. Auf Aminosäuren wird die Sekretion eingestellt, die Nektarien werden braun und sterben ab.

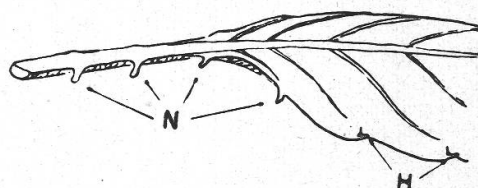
Schon R u h l a n d (1915) ließ abgeschnittene und auf Salzlösungen oder Wasser gelegte Salzdrüsen der *Plumbaginaceen* sezernieren. A g t h e (1951) hat analoge Versuche mit Nektarien durchgeführt und konnte zeigen, daß von den Nektarien keine Konzentrationsarbeit geleistet wird, d. h. nach 18—20 Stunden hatte sich die Konzentration des Sekretes derjenigen der Unterlage angeglichen. Eigene Versuche zeigten allerdings, daß die qualitative Beschaffenheit des Nektars im besten Fall erst nach 1—2 Tagen diejenige der Unterlage war. In einigen Fällen, wo die Nektarien auf einer 5prozentigen Glucoselösung schwammen, wurde sogar noch nach 10 Tagen neben Glucose Saccharose und Fructose sezerniert. Es ist allerdings zu beachten, daß etwas dicker geschnittene Nektarien langsamer, dafür aber länger sezernieren.

3. Versuche mit *Impatiens Holstii*

a) Dochtversuche

An den Blattstielen der meisten *Impatiens*-Arten (ausgenommen z. B. *I. noli tangere*) sitzen extraflorale Nektarien. Bei der Art *Impatiens Holstii* gibt es auf jeder Seite 4—5 solche Drüsen; sie sind ungefähr

Abbildung 4
Teil eines Blattes von *Impatiens Holstii*. N = Nektarien, H = Hydathoden (aus A g t h e, 1951)



2 mm lang und stäbchenförmig. Das äußerste Paar sitzt an der Basis der Blattspreite. Der Rand des übrigen Blattes ist mit vielen Zähnchen besetzt, die sich bei günstigen Guttationsbedingungen als Hydathoden erweisen. Die Sekretion der Nektarien ist sehr reichlich, die Nektartropfen erreichen Stecknadelkopfgröße. Steht die Pflanze in einem trockenen Raum, so kristallisiert der ausgetretene Zucker manchmal zu

wurmförmigen Körnchen. Schon frühere Untersuchungen (Aufrecht, 1891; Dahlgren, 1928, 1940; u. A.) zeigten, daß nur Saccharose im Nektar vorhanden ist. Die Sekretion reiner Saccharose ist offenbar eine Eigenart der Gattung *Impatiens*, denn neuere papierchromatographische Nektaranalysen von Wykes (1952, 1953) zeigten bei mehr als sechzig untersuchten Pflanzen neben Saccharose immer Glucose und Fructose. Auch eigene Untersuchungen an verschiedenen Gewächshauspflanzen bestätigten dies; Ausnahmen machten nur die Vertreter der Gattung *Impatiens*.

Die reichliche Sekretion von *Impatiens Holstii* und die Abwesenheit von Hexosen im Nektar ließen diese Pflanze als geeignetes Versuchsobjekt erscheinen. Die Dochte wurden auf die gleiche Art und Weise angesetzt wie bei *Euphorbia pulcherrima*. Es kam wieder eine 10prozentige Arabinoselösung zur Verwendung. Das Resultat war verblüffend. Wohl trat neben der Saccharose Arabinose im Nektar auf, daneben aber eine ganze Reihe zum Teil unbekannter Zucker.

Diese erstaunliche Reaktion der Pflanze veranlaßte uns, Dochtversuche mit verschiedenen andern Zuckern durchzuführen. Die Ergebnisse waren folgende:

Arabinose. Zuerst trat neben Saccharose und Arabinose noch Glucose auf, zugleich aber ein Oligosaccharid mit dem R_F -Wert im Bereich der Trisaccharide. Nach einigen Tagen erschien Fructose und ein weiteres Oligosaccharid mit etwas kleinerem R_F -Wert als das erste.

Fructose. Nach wenigen Tagen traten neben Saccharose Glucose und drei Oligosaccharide oberhalb Saccharose auf, in späteren Versuchen auch Fructose.

Sorbose. Ob Sorbose vorhanden war, konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden; dagegen erschienen auch hier Glucose, Fructose und zwei Oligosaccharide.

Glucose. Schon nach 1—2 Tagen war der Nektar glucosehaltig. Auch hier traten zwei Oligosaccharide auf.

Galactose. Die bisher immer angewandte Konzentration von 10 % erwies sich als zu stark, die Sekretion blieb aus, und nach wenigen Tagen starben die Pflanzen oberhalb der Wundstelle ab. Die Versuche wurden wiederholt mit 5, 2,5, 1,25, 0,625 % Galactose, in einer weiteren Serie mit 4, 2, 1, 0,5 und 0,25 %. Es zeigte sich, daß die kritische Konzentration bei ungefähr 1 % liegt. Bei größerer Konzentration stirbt die Pflanze oberhalb des Dochtes ab; bei kleinerer Konzentration kommen nach fünf Tagen Glucose und Fructose, nach zehn Tagen zwei Oligosaccharide im Nektar zum Vorschein.

Mannose. Die Reaktion war ähnlich wie bei Glucose. Mannose konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden.

Mit *Raffinose* blieben die Versuche erfolglos; mit *Mannit* erschien neben Saccharose Glucose, Fructose und ein Oligosaccharid, aber erst nach zwölf Tagen.

Weder im normalen noch im veränderten Nektar können Phosphorester nachgewiesen werden, die Molybdänblaureaktion (Entwicklungsmethode für Phosphorester nach H a n e s und I s h e r w o o d, 1949) verläuft in jedem Fall negativ.

Nach den ersten Versuchen mit Arabinose war der Gedanke nahelegend, daß die Pflanze den ins Phloem eingeführten Zucker verarbeite, und daß das gefundene Zuckerspektrum das Ergebnis komplizierter chemischer Umwandlungen sei. Der Vergleich von Nektar verschiedener Dochtversuche zeigte jedoch eindeutig, daß es sich immer um die gleichen Oligosaccharide handeln mußte, ob nun der Docht Glucose, Sorbose oder gar Mannit enthielt. Somit schien es sehr unwahrscheinlich, daß der experimentell eingeführte Zucker an ihrer Bildung beteiligt sei.

Das zuerst aufgetretene Oligosaccharid hat in Butanol-Essigsäure-Wasser den R_F -Wert zwischen denen der Saccharose und der Raffinose (etwas näher bei Raffinose); das zweite hat beinahe den gleichen wie Raffinose und wurde daher lange Zeit für Raffinose gehalten. In Wirklichkeit ist sein R_F -Wert etwas kleiner. Das dritte Oligosaccharid liegt noch etwas höher, d. h. sein R_F -Wert ist noch kleiner.

Die Reihenfolge und auch die Menge, mit denen die Zucker im Nektar erschienen, waren ganz charakteristisch. Zuerst traten neben Saccharose Spuren von Glucose und dem ersten Oligosaccharid auf; dann konnte man auch Fructose und das zweite Oligosaccharid feststellen, und zugleich hatten sich die Mengen des ersten Oligosaccharides und der Glucose vergrößert.

b) Einstellen von Trieben in Zuckerlösungen

Die Dochtversuche mit *Impatiens* wurden meist in einem kleinen, geschlossenen Raum bei zirka 25° C und 100 % Feuchtigkeit durchgeführt. Die Luftfeuchtigkeit ist erwünscht, da der Nektar dann flüssig bleibt und somit leicht auf das Chromatogramm gebracht werden kann; andererseits waren damit für die Hydathoden optimale Guttationsbedingungen geschaffen. Tatsächlich wurden auch große Wassermengen ausgeschieden. Chromatogramme von solchem Hydathodenwasser wiesen nie Zucker auf. Schneidet man nun 15—20 cm lange Triebe ab und stellt man sie in verschiedene Zuckerlösungen ein, so unterbleibt die Wasserausscheidung durch die Hydathoden. Da es sich um eine krautige Pflanze handelt, ist auch keine Guttation mehr zu erwarten, wenn der Wurzeldruck fehlt (F r e y - W y s s l i n g, 1949). Die Nektarien dagegen sezernieren weiter.

Stellt man die Triebe in eine 10prozentige Sorbose- bzw. Arabinose-lösung, so kann man nach kurzer Zeit diese Zucker im Nektar neben

der Saccharose nachweisen. Ob sie nun vom Xylem oder Phloem oder, was wahrscheinlicher ist, von beiden aufgenommen werden, wissen wir nicht, jedenfalls gelangen sie in freier Form bis in den Nektar. Werden die Triebe aber in Glucose- oder Fructoselösung eingestellt, so findet man keine Veränderung des Nektars, d. h. es wird nur Saccharose sezerniert. Diese beiden in der Pflanze vorkommenden Hexosen werden offenbar in den Stoffwechsel einbezogen.

c) Nektarien auf Zuckerlösungen

Die stäbchenförmigen Nektarien werden in den keilförmigen Schlitz eines zirka 1 mm dicken Korkscheibchens gesteckt. Man läßt sie dann auf einer Zuckerlösung schwimmen, und zwar so, daß die Schnittfläche in die Lösung taucht, das andere Ende aber senkrecht nach oben schaut. Die Bedingungen entsprechen auf diese Weise den bei *Euphorbia pulcherrima* durchgeführten Versuchen. Es konnte jedoch nie Nektar-ausscheidung festgestellt werden, auch nicht auf Wasser. Die Sekretion scheint bei dieser Pflanze mehr passiver Art zu sein.

IV. Die Oligosaccharide des Impatiens-Nektars

1. Hydrolyse

Bei Dochtversuchen tritt das erste Oligosaccharid neben der Saccharose des Nektars zeitlich zuerst auf, und zwar in Begleitung von Glucose. Sein R_F -Wert in Butanol-Essigsäure-Wasser liegt zwischen

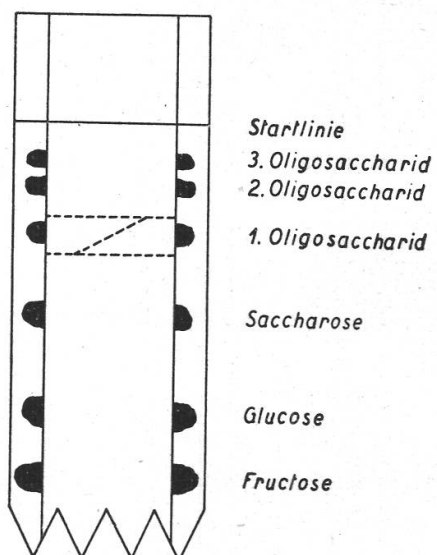


Abbildung 5

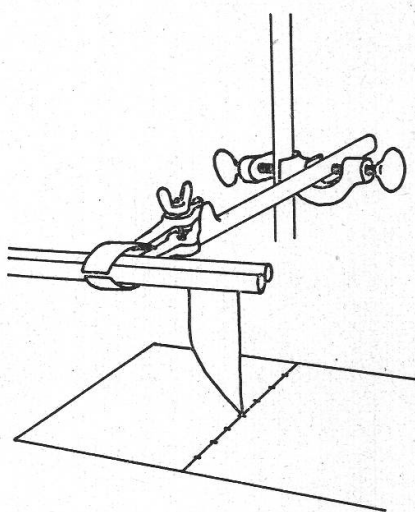
Auf der ganzen Startlinie ist der Nektar linienförmig aufgetragen worden. Nach dem Trennungsvorgang wurden die seitlichen Partien des Chromatogramms entwickelt und so die Lage der Zucker bestimmt. In der Richtung der gestrichelten Linien kann die gewünschte Partie ausgeschnitten werden

denjenigen von Saccharose und Raffinose, etwas näher bei Raffinose, und läßt daher ein Di- oder Trisaccharid vermuten. Die Reaktionsfarben mit den verschiedenen Entwicklungsmitteln sind genau gleich

wie bei Saccharose, zum Beispiel braun mit Anilinoxalat und schwach braun mit Anilinphthalat. Die Naphthoresorcin-Trichloressigsäure-Entwicklung ergibt einen leuchtend roten Fleck, was darauf hinweist, daß das Oligosaccharid ketosehaltig ist. Mit Triphenyltetrazoliumchlorid bleibt jede Reaktion aus, es ist also nicht reduzierend.

Der nächste Schritt ist nun die Hydrolyse des Zuckers. Vorerst muß er aber rein dargestellt werden. Zu diesem Zweck wird der Nektar auf der ganzen Startlinie eines Chromatogramms gleichmäßig aufgetragen. Nach dem Trennungsvorgang liegen die einzelnen Zucker in horizontalen Zonen senkrecht zur Fließrichtung der Trennlösung. Auf beiden Seiten des Chromatogramms wird ein Längsstreifen weggeschnitten und entwickelt, damit ist die Lage der Zucker festgestellt, und die Partie, die das erste Oligosaccharid enthält, kann mit der Schere heraus-

Abbildung 6
Übertragen des Zuckers auf ein
frisches Chromatogramm



geschnitten werden (Abbildung 5). Soll der nun rein dargestellte Zucker auf ein neues Chromatogramm übertragen werden, so schneidet man das Filterpapierstreifchen auf der einen Seite spitz zu und klemmt es mit dem andern Ende zwischen zwei Glasstäbe, die mit Muffe und Klemme an einem Stativ befestigt sind (Abbildung 6). Mit einer Pipette wird nun Wasser auf die Glasstäbe getropft, aber nur so viel, daß es vom Filterpapier langsam nach unten gesogen wird, es darf auf keinen Fall rasch dem Papier entlang herunterfließen. Ist die Wasserfront an der Papierspitze angelangt, so kann mit einem Startpunkt des neuen Chromatogramms die nun ziemlich konzentrierte Zuckerlösung direkt aufgenommen werden.

Die Hydrolyse erfolgt direkt auf dem Papier (Williams und Bevenue, 1951). Zum neuen Startpunkt des Zuckers auf dem Filterpapier werden wenige Kubikmillimeter Invertase¹ gegeben, die man einige Stunden einwirken läßt. Während dieser Zeit muß sich das Chro-

¹ Invertase Concentrate. British Drug House, Pool, England.

matogramm in einem feuchtigkeitsgesättigten Raum befinden, damit die Invertase nicht eintrocknet. Am einfachsten ist es, wenn man das Chromatogramm sofort nach Zugabe des Fermentes in das Chromatographiergefäß hängt. Nach Ablauf einiger Stunden kann dann die Trennlösung eingefüllt werden. Nach dem Trennungsvorgang wird das Chromatogramm entwickelt. Die gefundenen Hydrolyseprodukte erweisen sich als Glucose und Fructose. Hat man auf dem Chromatogramm in gleicher Weise Saccharose hydrolysiert und vergleicht die Hydrolysmengen miteinander, so erkennt man, daß im Oligosaccharid mehr Fructose als Glucose vorhanden ist. Wenn die Hydrolyse sauber gelingt, so kann die Bestimmung der Hydrolysate quantitativ durchge-

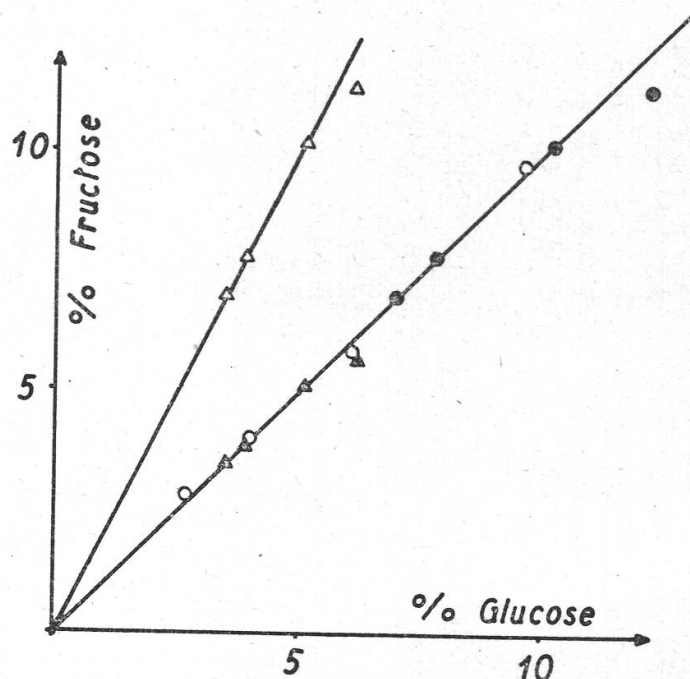


Abbildung 7
Quantitative Hydrolyse des ersten
Oligosaccharides. Trennlösung
Butanol-Ameisensäure-Wasser
Laufzeit 120 Stunden
(Erklärung im Text)
○ Saccharose hydrolysiert
△ 1. Oligosaccharid hydrolysiert
▲ do. Fructosewert halbiert
● do. Glucosewert verdoppelt

führt werden. Die genauesten Resultate lieferte die Methode nach Somogyi (1945) - Nelson (1944). Die Trennung von Glucose und Fructose mit dem Butanol-Essigsäure-Wasser-Gemisch, die für qualitative Zwecke vollauf genügt, erweist sich für die quantitativen Bestimmungen als mangelhaft, besonders für größere Mengen. Die Verwendung von Butanol-Ameisensäure-Wasser (nach Wiggins und Williams, 1952) gewährleistet dagegen absolut einwandfreie Resultate. Da die R_F -Werte sehr klein sind, benötigt man allerdings Laufzeiten von fünf Tagen. Jede Hydrolyse liefert im Photometer je vier Meßresultate für Glucose und Fructose (Extinktionswerte in vier Wellenbereichen), nach denen an den Eichkurven die entsprechenden Zuckermengen abgelesen werden können. Von den vier Werten wird der Durchschnitt genommen. Jedes Hydrolysenresultat von Saccharose wird in einem Diagramm mit dem Glucose- und dem Fructosegehalt als

Koordinaten eingetragen (Abbildung 7). Die Punkte müssen auf einer Geraden liegen, die vom Nullpunkt ausgehend unter 45° ansteigt (Glucose : Fructose = 1 : 1). Hydrolysiert man das erste Oligosaccharid und trägt die gefundenen Werte in gleicher Weise auf, so zeigt sich, daß es aus zwei Teilen Fructose und einem Teil Glucose besteht (Dreiecke im Diagramm). Halbiert man den Fructosewert (schwarze Dreiecke) oder verdoppelt man den Glucosewert (schwarze Punkte), so kommt man auf die Gerade der Saccharose.

Zusammen mit dem R_F -Wert zeigt das Hydrolysenresultat eindeutig, daß ein Trisaccharid vorliegt, das aus zwei Molekülen Fructose und einem Molekül Glucose besteht.

Wenn man die Invertase stark verdünnt und nur kurz einwirken läßt, wird das Trisaccharid nur partiell aufgespalten, und zwar in Saccharose, Glucose und Fructose (Abbildung 9); es muß also aus Saccharose und Fructose aufgebaut sein. Auf einigen Chromatogrammen, die mit TTC entwickelt wurden, erschien bei partieller Hydrolyse Fructose und ein rezudierender Stoff mit etwas kleinerem R_F -Wert als Saccharose. Daher darf man vielleicht vermuten, daß das Fructosemolekül an eine Hydroxylgruppe der Glucose gebunden ist. Durch die Spaltung der Saccharosebindung müßte das Trisaccharid dann in Fructose und ein Glucose-Fructosid zerfallen.

Die Hydrolyse kann auch mit Salzsäure direkt auf dem Papier durchgeführt werden. Ein Tropfen der Säure wird auf den Startpunkt des Papiers gegeben, der den Zucker enthält, und das Chromatogramm während einer halben Stunde in wasserdampfgesättigter Atmosphäre auf 100°C erwärmt. Die Säurekonzentration muß dann allerdings so klein gewählt werden, daß die Zellulose des Papiers nicht mit angegriffen wird. Blindproben zeigten, daß die günstigste Konzentration bei $n/50$ liegt. Die Hydrolyse ist auch hier partiell und liefert Saccharose, Glucose und Fructose.

Das zweite Oligosaccharid hat einen R_F -Wert, der in Butanol-Essigsäure-Wasser etwas kleiner ist als derjenige von Raffinose. Seine Reaktionen mit den verschiedenen Entwicklungsmitteln sind gleich wie diejenigen der Saccharose und des Trisaccharids. Es ist also nicht reduzierend und ketosehaltig. Das dritte, dessen R_F -Wert noch etwas kleiner ist, zeigt ebenfalls dieselben Reaktionen.

Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, um die Hydrolysenprodukte der einzelnen Oligosaccharide zu vergleichen. Eine einfache Methode bedient sich der zweidimensionalen Papierchromatographie. Der Nektar, der aus dem Gemisch der verschiedenen Zucker besteht, wird auf einem quadratischen Filterpapier aufgetragen. Nach dem ersten Trennungsvorgang wird das Chromatogramm getrocknet. Die einzelnen Zucker liegen nun auf einer Geraden im Papier, das an dieser Stelle mit einer wässrigen Invertaselösung besprüht wird. Das Besprü-

hen muß mit einem sehr feinen Zerstäuber erfolgen, damit die Flecke nicht verwischt werden. Die zweite Trennung erfolgt senkrecht zur ersten, dann wird das Chromatogramm getrocknet und entwickelt. Abbildung 8 zeigt ein solches zweidimensionales Chromatogramm. Man erkennt deutlich, daß die Oligosaccharide alle aus Glucose und Fructose bestehen und daß der Fructosegehalt mit kleiner werdendem R_F -Wert größer wird. Tatsächlich zeigt die totale Hydrolyse des zweiten Oligosaccharides das Verhältnis Glucose : Fructose = 1 : 3. Die Bestimmung nach Somogyi-Nelson erfolgte in der gleichen Weise, wie oben beschrieben wurde. Abbildung 9 zeigt die partielle Hydrolyse des zweiten Oligosaccharides. Die Abbauprodukte sind: 1. Oligosaccharid, Saccharose (Spur), Glucose und Fructose. Aus all diesen Resultaten kann geschlossen werden, daß es sich um ein Tetrasaccharid handelt, das aus einem Molekül des untersuchten Trisaccharides und einem Molekül Fructose besteht.

2. Enzymatische Synthese in vitro

Bringt man in wenige Kubikzentimeter einer etwa 7prozentigen Saccharoselösung einige Kubikmillimeter des veränderten *Impatiens*-Nektars, so findet man schon nach wenigen Tagen neben der Saccharose das Trisaccharid und Glucose. Nach einem Monat tritt auch Fructose auf, und die Trisaccharid- und Glucosemengen haben sich vergrößert. Die Veränderung der Saccharose erfolgt also gleich wie im Nektar von *Impatiens*, mit dem Unterschied, daß nur das erste Oligosaccharid auftritt. Den zeitlichen Verlauf für zwei solche Proben zeigt Abbildung 10. Die eine Probe weist sehr geringe, die andere bedeutend stärkere Trisaccharidbildung auf. Es zeigte sich, daß bei Zugabe einer etwas größeren Nektarmenge zur Saccharoselösung auch das zweite Oligosaccharid gebildet wird. In Tabelle 1 sind die entsprechenden Werte zusammengestellt. Die Messungen wurden für jeden Zeitpunkt viermal durchgeführt, und zwar auf folgende Weise: Alle fünf Zucker werden extrahiert. Zur gleichen Zeit wird auch ein leeres Stück des Chromatogramms ausgewaschen. Jede der sechs Proben wird mit $0,05 \text{ cm}^3$ Invertasekonzentrat versetzt und so lange stehen gelassen, bis die Saccharose und das Trisaccharid vollständig abgebaut sind. Dann erfolgt die Bestimmung nach Somogyi-Nelson. Die Zuckermengen werden alle an der Glucose-Eichkurve abgelesen und überall der Papier-(Invertase-)Blindwert abgezogen. Da die Farbreaktion für Glucose etwas intensiver ist als für Fructose (1,1 : 1), müssen die Fructose- und Oligosaccharidwerte korrigiert werden. Der Fructosewert wird mit 1,1, der Saccharosewert (Glucose : Fructose = 1 : 1) mit 1,05, der Trisaccharidwert (Glucose : Fructose = 1 : 2) mit 1,067 und der Tetrasaccharidwert (Glucose : Fructose = 1 : 3) mit 1,075 multipliziert. Auf

diese Weise erhalten wir die relativen Zuckermengen, ausgedrückt in Hexosen. Sie werden nun in Prozent der totalen Hexosemenge umgerechnet. Es besteht insofern eine Kontrollmöglichkeit der Resultate, als die totale Glucose- bzw. Fructosemenge zu jedem Zeitpunkt 50 % sein muß (siehe Tabelle).

Was ist nun für diesen Zuckerumbau in vitro verantwortlich? Eine Bakterien- oder Pilzinfektion ist ausgeschlossen, denn erstens wurden

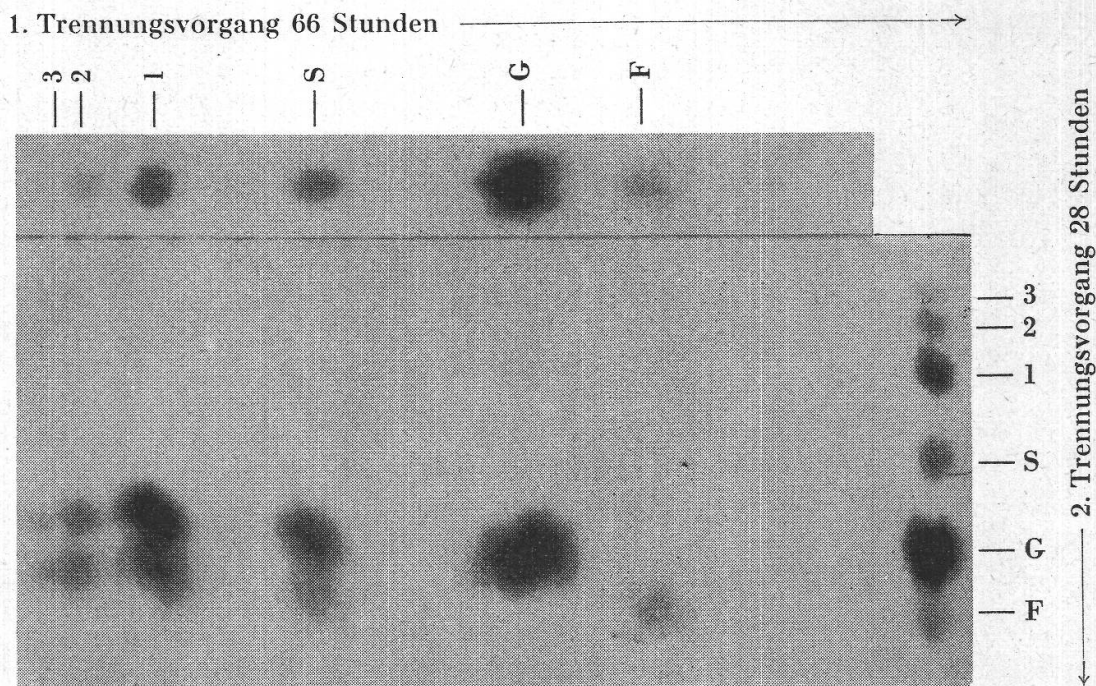


Abbildung 8

Zweidimensionales Chromatogramm des veränderten *Impatiens*-Nektars. Durch die Entwicklung eines Kontrollstreifens nach dem ersten Trennungsvorgang wird die Lage der Zucker im Chromatogramm festgestellt und die entsprechende Partie mit einer wäßrigen Invertaselösung besprüht. Dann folgt der zweite Trennungsvorgang, durch den die Hydrolyseprodukte dargestellt werden. Entwickelt wurde mit Anilinoxalat. Es ist deutlich zu erkennen, daß alle Oligosaccharide Glucose und Fructose enthalten. Der Fructosegehalt nimmt mit kleiner werdendem P_F -Wert zu. Man beachte indessen, daß die Entwicklung für Glucose zirka viermal empfindlicher ist als für Fructose. (Das Hydrolysatverhältnis bei Saccharose ist 1 : 1!)

Trennlösung: *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser

die Lösungen steril gehalten (Zugabe von Chloroform), und zweitens verändert sich eine Saccharoselösung ohne Nektar nicht. Es können nur Fermente in Frage kommen, die von der Pflanze mit dem Nektar ausgeschieden werden. Tatsächlich bleibt bei Proben, die kurz aufgekocht wurden, jede Reaktion aus. Vergleicht man die Resultate mit denjenigen verschiedener Autoren, die die Kinetik der enzymatischen Hydrolyse von Disacchariden untersucht haben, so besteht kein Zweifel,

daß die Bildung der Oligosaccharide der gruppenübertragenden Wirkung eines saccharosespaltenden Enzyms zuzuschreiben ist. Deshalb soll im folgenden Abschnitt das Wichtigste der bisherigen Untersuchungen über diese interessante Erscheinung kurz besprochen werden.

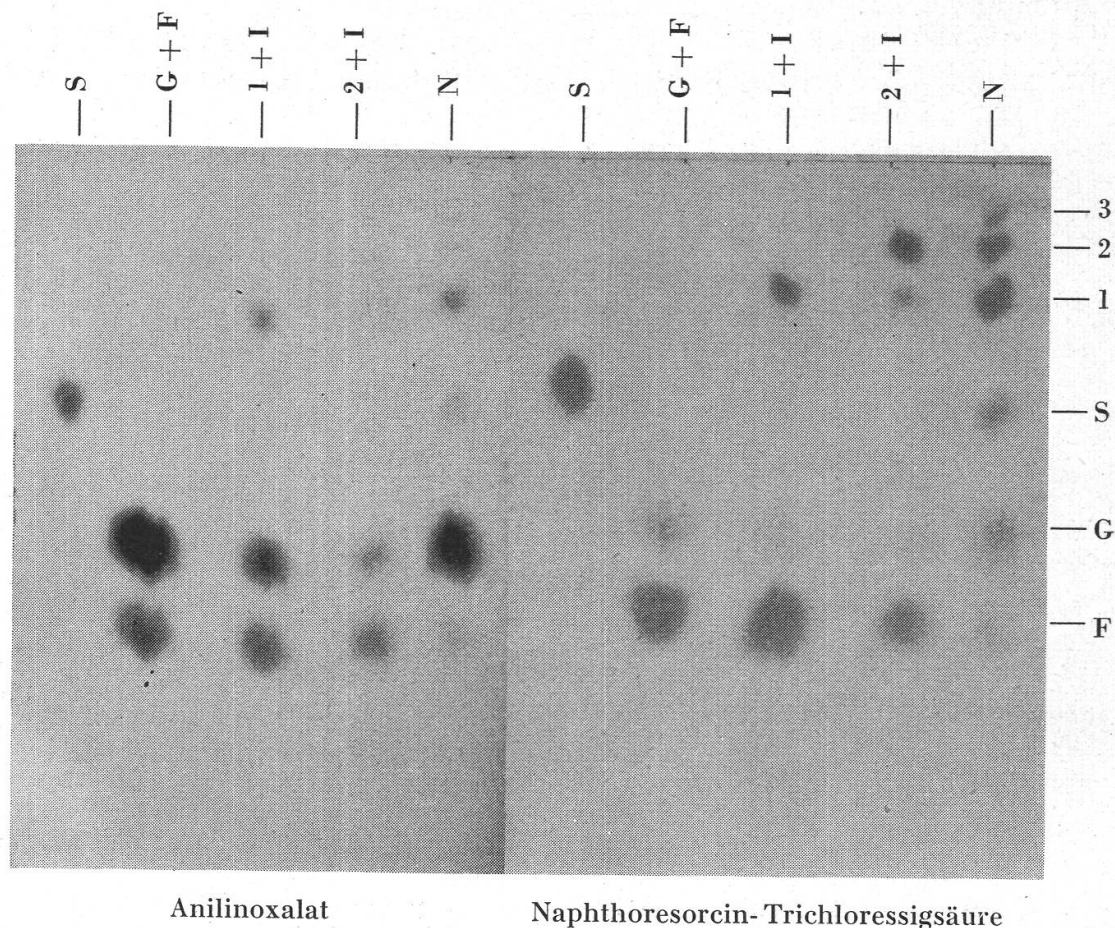


Abbildung 9

Zwei eindimensionale Chromatogramme mit verschiedener Entwicklung. Darstellung der partiellen Hydrolyse des ersten und zweiten Oligosaccharides. Die Spaltprodukte des ersten sind Saccharose, Glucose und Fructose, diejenigen des zweiten sind: erstes Oligosaccharid, Saccharose (Spur), Glucose und Fructose. S = Saccharose, G + F = Glucose + Fructose im Verhältnis 1 : 1 (Saccharose hydrolysiert), 1 = 1. Oligosaccharid, 2 = 2. Oligosaccharid, I = verdünnte Invertase, N = Nektar

Trennlösung: Butanol-Essigsäure-Wasser (48 h)

3. Über die gruppenübertragende Wirkung saccharosespaltender Enzyme

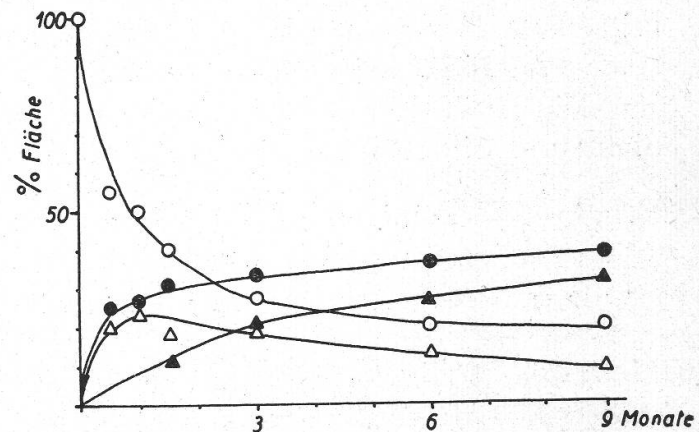
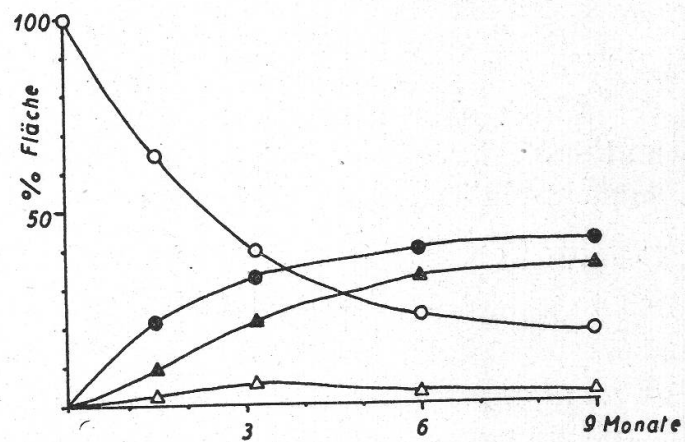
Bacon und Edelman (1950) und zu gleicher Zeit Blanchard und Albion (1950) fanden erstmals, daß der Verlauf der enzymatischen Hydrolyse von Saccharose komplizierter verläuft, als man bisher angenommen hatte. Sie stellten fest, daß sofort nach dem Beginn der Reaktion einige fructosehaltige Oligosaccharide auftreten, die so lange

Tabelle 1

| | 18 Tage | | | 38 Tage | | | 2 Monate | | | 3 Monate | | |
|----------------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|----------|-------|-------|----------|-------|-------|
| | total | G | F | total | G | F | total | G | F | total | G | F |
| Tetrasaccharid | | | | 6,2 | 1,55 | 4,65 | 11,7 | 2,92 | 8,78 | 19,9 | 4,98 | 14,92 |
| Trisaccharid | 8,3 | 2,77 | 5,53 | 28,5 | 9,5 | 19,0 | 32,8 | 10,93 | 21,87 | 32,4 | 10,8 | 21,6 |
| Saccharose | 83,5 | 41,75 | 41,75 | 52,0 | 26,0 | 26,0 | 33,3 | 16,65 | 16,65 | 24,0 | 12,0 | 12,0 |
| Glucose | 6,4 | 6,4 | | 11,4 | 11,4 | | 19,7 | 19,7 | | 20,7 | 20,7 | |
| Fructose | 1,8 | | 1,8 | 1,9 | | 1,9 | 2,5 | | 2,5 | 3,0 | | 3,0 |
| Kontrolle | | 50,92 | 49,08 | | 48,45 | 51,55 | | 50,2 | 49,8 | | 48,48 | 51,52 |

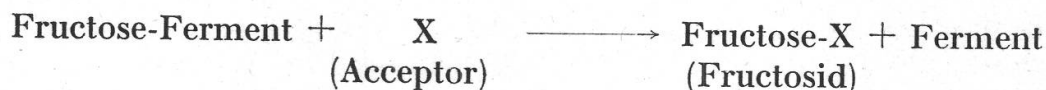
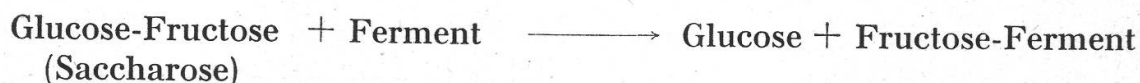
Abbildung 10
Veränderung einer Saccharose-
lösung in Anwesenheit von
Impatiens-Nektar. Die Flecken-
größe wurde auf dem Chromato-
gramm planimetriert und in Pro-
zent der totalen Fleckenfläche
umgerechnet (Entwicklung der
Chromatogramme mit Anilin-
oxalat)

- Saccharose
- △ Trisaccharid
- Glucose
- ▲ Fructose

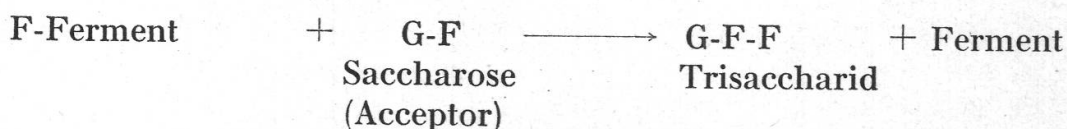


im Gemisch nachgewiesen werden können, bis die Saccharose vollständig zerfallen ist. Alle bis jetzt bekannten saccharosespaltenden Enzyme sind Fructosidasen (Bealing, 1952), auch diejenigen, die früher als Glucosidasen (Glucosaccharasen) angesehen worden waren. Die Fermente katalysieren die Reaktion, indem sie das Fructosemolekül von

Saccharose auf einen Acceptor übertragen (B a c o n und E d e l m a n , 1951; F i s c h e r et al., 1951):



Zuerst wird Glucose frei, dann wird das Fructosemolekül auf einen Acceptor übertragen. Wenn nur Wasser als Acceptor figurieren würde, dann wäre der Abbau einfach. In Wirklichkeit dient aber auch Saccharose dazu, und so entsteht ein Trisaccharid aus Saccharose und Fructose:



Sofort nach dem Beginn der Reaktion tritt also zugleich Glucose und das Trisaccharid auf. Ist das entstandene Trisaccharid Acceptor, so entsteht ein Tetrasaccharid usw.:

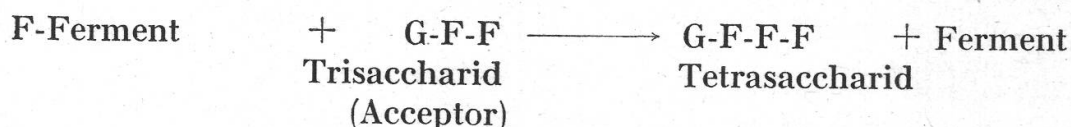
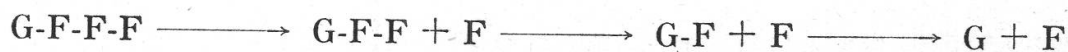


Abbildung 11 möge einen Überblick geben über die Verschiedenartigkeit einiger Transfructosidasen, die in der Bauart der Oligosaccharide zum Ausdruck kommt. Den Verlauf der Saccharosehydrolyse mit einem Enzymextrakt aus *Penicillium spinulosum* (B e a l i n g und B a c o n , 1953) zeigt Abbildung 12.

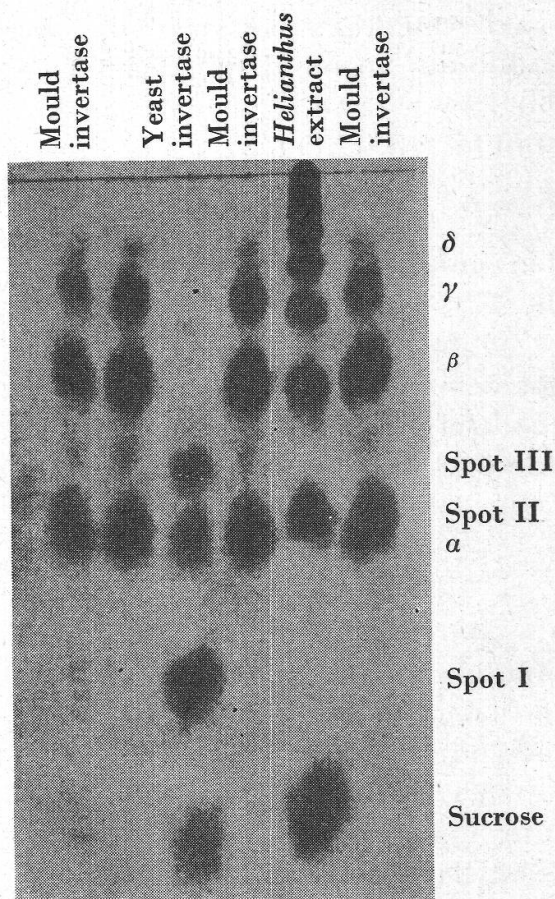
Die Hydrolyse kommt zustande, indem auch Wasser als Acceptor dient und die Oligosaccharide ständig wieder abgebaut werden:



Diese Fructoseübertragung durch Invertasen, von E d e l m a n und B a c o n (1951) Transfructosidation genannt, führt durch Zugabe von andern Acceptoren, zum Beispiel Alkoholen, zur Bildung von Alkylfructosiden (B a c o n , 1952). Führt man die Hydrolyse in Anwesenheit von andern Zuckern durch, zum Beispiel Pentosen, so entstehen pentosehaltige Oligosaccharide. Man kann auf diese Weise die verschiedensten Oligosaccharide synthetisch herstellen.

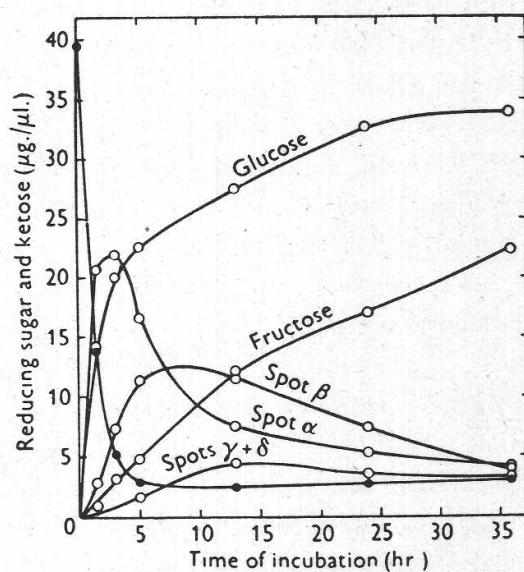
Es zeigte sich, daß diese fructoseübertragende Wirkung im engsten Zusammenhang mit dem Inulinstoffwechsel steht. Inulin ist ein Fruc-

Abbildungung 11
Mittlere Abbaustufen von Saccharose mit Hilfe von verschiedenen Fermenten. Jedes Ferment liefert ganz bestimmt gebaute Oligosaccharide, daher ist das chromatographische Bild für jedes Ferment charakteristisch
(Aus Bealing und Bacon, 1953)



Abbildungung 12
Zeitlicher Verlauf der Saccharosehydrolyse mit Hilfe eines Enzymextraktes aus *Penicillium spinulosum*
(Aus Bealing und Bacon, 1953)

●—● Saccharose
α G-F-F
β G-F-F-F
γ G-F-F-F-F



tosepolysaccharid ähnlich der Stärke. Dedonder (1950, a—c) isolierte auf papierchromatographischem Wege aus Topinamburknollen zehn verschiedene fructosehaltige Oligosaccharide mit den R_F -Werten zwischen denjenigen von Fructose und 0 (Inulin). Edelman und Bacon (1951) gelang es, aus den Knollen von *Helianthus tuberosus* L.

ein Ferment zu isolieren, das Fructosemoleküle von Saccharose und Inulin auf vorhandene Acceptoren überträgt. Der Inulinabbau geht über ein Disaccharid, das wahrscheinlich mit Saccharose identisch ist. Es konnte tatsächlich Glucose im Inulin festgestellt werden. Der Unterschied zwischen den Inulinfermenten und den Invertasen ist also nicht so groß, wie früher allgemein angenommen wurde. Es handelt sich bei den Inulinfermenten offenbar einfach um Transfructosidasen, die auf die 1-Stellung der Fructose spezialisiert sind.

Zum Schluß sei noch erwähnt, daß auch der Maltose- und Lactoseabbau untersucht worden sind, und daß dort ganz ähnliche Verhältnisse anzutreffen sind (Pan et al., 1950; Pazur und French, 1951; Wallenfels, 1951; Wallenfels und Bernt, 1952; Aronson, 1952).

4. Die Transfructosidase des *Impatiens*-Nektars

Wie bereits erwähnt, sind schon eine ganze Reihe von Transfructosidasen bekannt. Sie unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer gruppenübertragenden Wirkung. Abbildung 11 zeigt mittlere Abbaustadien von Saccharose unter Einwirkung von Fermenten verschiedener Herkunft. Vergleicht man das Chromatogramm mit den Abbildungen 8 oder 9, so kann man eine sehr große Ähnlichkeit der chromatographischen Bilder feststellen. Da auch der zeitliche Verlauf (Abbildungen 10 und 12) sehr ähnlich ist, besteht gar kein Zweifel darüber, daß wir es im Nektar mit einer Transfructosidase zu tun haben, die mit der Schimmelpilzinvertase sehr nahe verwandt ist. Eine genaue Abklärung dieser Frage ist jedoch nur möglich, wenn das Ferment in größerer Menge isoliert und die Konstitution seiner Oligosaccharide durch Methylierung und anschließende Hydrolyse aufgeklärt wird.

Was uns aber vom physiologischen Standpunkt aus besonders interessiert, ist die Frage, unter welchen Bedingungen die Invertase des *Impatiens*-Nektars auftritt. Sammelt man den Nektar von normalen Pflanzen und läßt man ihn bei Zimmertemperatur stehen, so kann man nach zwei bis drei Wochen Spuren des Trisaccharides und Glucose feststellen, was auf eine geringe Invertaseaktivität schließen läßt. Es sind im normalen Nektar also bereits kleine Fermentmengen vorhanden. Durch die Injektion von Zuckern ins Phloem der Pflanze wird die Bildung von Invertase so stark gesteigert, daß die Saccharose des Nektars bei der Sekretion bereits weitgehend gespalten ist (Auftreten von Fructose, Glucose und Oligosacchariden). Es ist aber sehr unwahrscheinlich, daß die Fermentausscheidung direkt mit den injizierten Zuckern im Zusammenhang steht. Der Versuch gelingt nämlich auch, wenn die Zuckerlösung des Dochts durch Wasser ersetzt wird. Eine weitere Möglichkeit, die Pflanze zur Invertaseproduktion anzuregen, besteht darin, daß man sie während mehrerer Tage im Dunkeln hält. Bei einer sol-

chen Versuchsreihe konnte schon nach 24 Stunden eine Saccharose-spaltung festgestellt werden. Allgemein ist zu sagen, daß die Ausscheidung von größeren Fermentmengen sehr launisch erfolgt. Es wurden verschiedene Versuchsreihen angesetzt, um festzustellen, unter welchen Bedingungen die Invertase in größeren Mengen gebildet wird; doch lassen sich die Versuche keineswegs immer reproduzieren. Immerhin deuten die Resultate darauf hin, daß feuchtwarmes Klima, Verletzung der Pflanze und geringe Beleuchtung günstig wirken.

Das spontane Auftreten des Fermentes im feuchtwarmen Klima und seine Ähnlichkeit mit der Schimmelpilzinvertase ließ den Verdacht aufkommen, daß es sich tatsächlich um solche handelt. Man könnte sich denken, daß die Invertase des Nektars nicht von der Pflanze selbst stammt, sondern von geringsten übersehenen Pilzmengen im Nektar.

Tabelle 2

| | Normale Pflanze (fast keine Invertaseproduktion) | Pflanze mit Docht (starke Invertaseproduktion) |
|------------|---|---|
| Nektar | Saccharose | Oligosaccharide + Saccharose + Glucose + Fructose |
| Nektarium | Saccharose + Glucose + Fructose | Oligosaccharide + Saccharose + Glucose + Fructose |
| Blattstiel | Glucose | Glucose |
| Stengel | Glucose | Glucose |

Dies ist indessen nicht so. Nektarien wurden durch Waschen mit warmem Wasser vom Nektar befreit und auf den Startpunkt eines Chromatogramms zerquetscht. Es zeigte sich, daß die Oligosaccharide schon im Nektarium vorhanden sind. Mit Hilfe von Querschnitten durch Blattstiel und Stengel wurde ferner die Lage des Phloems in der Pflanze festgestellt und die entsprechenden Partien mit einer feinen Glaspipette etwas gequetscht und der so erhaltene Gewebesaft chromatographiert. Es wurde jedoch nur Glucose gefunden (Tabelle 2). Wenn der Nektar mit dem Phloemsaft identisch ist, so erwartet man nicht Glucose, sondern Saccharose. Offenbar handelt es sich aber bei diesen Proben zur Hauptsache um Vacuolenflüssigkeit des angrenzenden Parenchymgewebes, da das Phloem volumenmäßig sehr klein ist. Die Gewinnung von reinem Phloemsaft bei *Impatiens Holstii* ist praktisch unmöglich, daher kann der Nektar nicht direkt mit dem Phloemsaft verglichen werden. Immerhin zeigen neuere Untersuchungen von Wanner (1953, a, b), daß der Siebröhrensaft von *Robinia Pseud-Acacia* als ein-

ziges Kohlehydrat Saccharose enthält. Zudem kann W a n n e r keine Invertasewirkung des Phloemsaftes feststellen, dadurch ist die Stabilität der Saccharose erklärt. Obwohl es sich um ganz verschiedene Versuchspflanzen handelt, stimmen diese Resultate mit den unsrigen gut überein.

V. Zusammenfassung

1. Arabinose, die man mit Hilfe von R o u s c h a l s Dochtmethode ins Phloem von *Euphorbia pulcherrima* diffundieren läßt, wird von den Nektarien ausgeschieden. Damit ist der anatomische Befund A g t h e s über die Phloemversorgung der Nektarien physiologisch bestätigt.
2. Abgeschnittene und in Zuckerlösungen eingestellte Scheinblüten von *Euphorbia pulcherrima* zeigen dasselbe Resultat: Mit dem Xylem besteht physiologisch keine, mit dem Phloem dagegen eine sehr deutlich nachweisbare Verbindung zum Nektarium.
3. Abgeschnittene, auf Zuckerlösungen schwimmende Nektarien von *Euphorbia pulcherrima* sezernieren drei bis zehn Tage weiter. Der Zuckergehalt des Nektars gleicht sich in dieser Zeit der Unterlage an.
4. Auch bei *Impatiens Holstii* kann die Phloemversorgung der Nektarien mit Hilfe von Arabinosedochten bewiesen werden. Die Dochtversuche verursachen die Ausscheidung einer Transfructosidase mit dem Nektar. Im Nektar, der normalerweise nur reine Saccharose enthält, tritt dann auch Glucose, Fructose und eine Reihe von Oligosacchariden auf.
5. Werden abgeschnittene Triebe von *Impatiens Holstii* in Glucose- oder Fructoselösungen gestellt, so wird nur Saccharose sezerniert. Arteigene Zucker werden von der Pflanze offenbar in den Stoffwechsel einbezogen. Stellt man die Triebe aber in eine Sorbose- oder Arabinoselösung, so gelangen diese artfremden Zucker neben der Saccharose des Nektars unverändert wieder zur Ausscheidung.
6. Auf Zuckerlösungen und Wasser schwimmende Nektarien von *Impatiens Holstii* sezernieren nicht.
7. Die bei den Dochtversuchen auftretenden Oligosaccharide im *Impatiens*-Nektar haben mit steigendem Molekulargewicht bzw. kleiner werdendem R_F -Wert steigenden Fructosegehalt. Die totale quantitative Hydrolyse des ersten Oligosaccharides ergibt Glucose : Fructose = 1 : 2. Die partielle Hydrolyse zeigt, daß es sich um ein Trisaccharid handeln muß, das aus Saccharose und Fructose besteht. Das zweite Oligosaccharid ist ein Tetrasaccharid mit dem Hydrolysatverhältnis Glucose : Fructose = 1 : 3. Die Produkte der partiellen Hydrolyse sind Fructose, Glucose, Saccharose (Spur) und das Trisaccharid.

8. Nach Zufügung von einer sehr kleinen Menge des veränderten *Impatiens*-Nektars zu 7prozentiger Saccharose wird die Saccharose durch die Transfructosidase abgebaut. Als vorübergehendes Syntheseprodukt tritt das Trisaccharid, eventuell kleine Mengen des Tetrasaccharides, auf.
9. Geringe Mengen von Invertase sind bereits im normalen Nektar vorhanden. Die plötzliche starke Steigerung der Invertaseproduktion erfolgt sehr launisch. Feuchtwarmes Klima, Verletzung der Pflanze und schwache Beleuchtung scheinen sie jedoch zu begünstigen.
10. Die Oligosaccharide, und damit die Invertase, können schon innerhalb der Pflanze, d. h. im Nektarium, nachgewiesen werden.

VI. Literatur

- Agthe, C., 1951. Über die physiologische Herkunft des Pflanzennektars. Ber. Schweiz. Bot. Ges., **61**, 240.
- Aronson, M., 1952. Transgalactosidation During Lactose Hydrolysis. Arch. Biochem. Biophys., **39**, 370.
- Aufrecht, S., 1891. Beitrag zur Kenntnis extrafloraler Nektarien. Inaugural-Diss., Universität Zürich.
- Bacon, J. S. D., 1952. Transfructosidation by a Yeast Invertase Preparation. Biochem. J., **50**, XVIII.
- Edelman, J., 1950. The Action of Invertase Preparations. Arch. of Biochem., **28**, 467.
- — 1951. The Carbohydrates of the Jerusalem Artichoke and other Compositae. Biochem. J., **48**, 114.
- Bealing, F. J., 1952. The Transfructosidase Activity of Mould Invertase Preparations. Thesis, University of Sheffield.
- Bacon, J. S. D., 1953. The Action of Mould Enzymes on Sucrose. Biochem. J., **53**, 277.
- Blanchard, P. H., Albion, N., 1950. The Inversion of Sucrose; a Complication. Arch. of Biochem., **29**, 220.
- Bonnier, G., 1879. Les Nectaires. Thèse, Paris.
- Consdon, R., Gordon, A. H., Martin A. J. P., 1944. Qualitative Analysis of Proteins: a Partition Chromatographic Method Using Paper. Biochem. J., **38**, 224.
- Cramer, F., 1952. Papierchromatographie. Verlag Chemie, Weinheim.
- Czarnowski, C., 1952. Untersuchungen zur Frage der Nektarabsonderung. Archiv für Geflügelzucht und Kleintierkunde, Heft 1.
- Dahlgren, O. K. V., 1928. Über die Zuckerabscheidung der Blätter von *Impatiens Sultanii*. Bot. Notiser.
- 1940. On the Excretion of Sugar in *Impatiens*. Särtryck ur Svensk Bot. Tidskrift, **34**, 53.
- Dedonder, R., 1950. Les glucides du Topinambour. I. Produits intermédiaires dans l'hydrolyse acide de l'inuline. C. R. Acad. Sci. Paris, **230**, 549.

- Dedonder, R., 1950. Les glucides du Topinambour. II. Rapports entre la composition glucidique des tubercules du Topinambour et les produits d'hydrolyse de l'inuline. C. R. Acad. Sci. Paris, **230**, 997.
- Buvry, C., 1950. Les glucides du Topinambour. III. Données sur leur synthèse biologique. C. R. Acad. Sci. Paris, **231**, 790.
- Draper, O., Janet, O., Pollard, A. L., 1949. The Purification of Phenol for the Paper Partition Chromatography. Science, **109**, 448.
- Edelman, J., Bacon, J. S. D., 1951. The Action of a Hydrolytic Enzyme System from *Helianthus tuberosus* L. on Carbohydrates present in the Tubers. Biochem. J., **49**, 446.
- — 1951. Transfructosidation in Extracts of the Tubers of *Helianthus tuberosus* L. Biochem. J., **49**, 529.
- Fischer, E. H., Kohtès, L., Fellig, J., 1951. Propriétés de l'invertase purifiée. Helv. Chim. Acta, **34**, 1132.
- Fisher, R. B., Parsons, D. S., Morrison, G. A., 1948. Quantitative Paper Chromatography. Nature, **161**, 764.
- Frei, E., 1952. Die Phloemversorgung der floralen Nektarien. Diplomarbeit ETH.
- Frey-Wyssling, A., 1933. Über die physiologische Bedeutung der extrafloralen Nektarien von *Hevea brasiliensis*. Ber. Schweiz. Bot. Ges., **42**, 1.
- 1949. Stoffwechsel der Pflanzen. Büchergilde Gutenberg, Zürich, 133.
- Agthe, C., 1950. Nektar ist ausgeschiedener Phloemsaft. Verhandlungen der Schweiz. Naturforschenden Ges., 175.
- Hanes, C. S., Isherwood, F. A., 1949. Separation of the Phosphoric Esters on the Filter Paper Chromatogram. Nature, **164**, 1107.
- Liebig, J., 1846. Agriculturchemie. 6. Auflage, 137.
- Nelson, N., 1944. A Photometric Adaption of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. J. Biol. Chem., **153**, 375.
- Nieuwenhuis von Uexküll-Güldenbandt, M., 1907. Extraflorale Zuckerausscheidungen und Ameisenschutz. Annales du Jardin botanique de Buitenzorg, 2. Serie, **6**, 195.
- Pan, S. C., Andreasen, A. A., Kolachov, P., 1950. Enzymic Conversion of Maltose into Unfermentable Carbohydrate. Science, **112**, 115.
- Partridge, S. M., 1946. Application of the Paper Partition Chromatography to the Qualitative Analysis of Reducing Sugars. Nature, **158**, 270.
- 1949. Aniline Hydrogen Phtalate as a Spraying Reagent for Chromatography of Sugars. Nature, **164**, 443.
- 1951. Partition Chromatography and its Application to Carbohydrate Studies. Biochem. Soc. Symp. Nr. 3, 52.
- Westhall, R. G., 1948. Filter Paper Partition Chromatography of Sugars. Biochem. J., **42**, 238.
- Pazur, J. H., French, D., 1951. The Transglucosidase of *Aspergillus oryzae*. J. Am. Chem. Soc., **73**, 3536.
- Rouschal, E., 1941. Untersuchungen über die Protoplasmatik und Funktion der Siebröhren. Flora, **135**.
- Ruhland, W., 1915. Untersuchungen über die Hautdrüsen der *Plumbaginaceen*. Jb. wiss. Bot., **55**, 409.
- Schumacher, W., 1933. Untersuchungen über die Wanderung des Fluoreszeins in den Siebröhren. Jb. wiss. Bot., **77**, 685.
- 1937. Weitere Untersuchungen über die Wanderung von Farbstoffen in den Siebröhren. Jb. wiss. Bot., **85**, 422.
- Somogyi, M., 1945. A New Reagent for the Determination of Sugars. J. Biol. Chem., **160**, 61.

- Strugger, S., 1938. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoreszeinkaliums in pflanzlichen Geweben. *Flora*, **32**.
- Wallenfels, K., 1950. Über einen neuen Nachweis reduzierender Zucker im Papierchromatogramm und dessen quantitative Auswertung. *Naturw.*, **37**, 491.
- 1951. Enzymatische Synthese von Oligosacchariden aus Disacchariden. *Naturw.*, **38**, 306.
- Bernt, E., 1952. Über die gruppenübertragende Wirkung von disaccharidspaltenden Enzymen. *Angew. Chem.*, **64**, 28.
- Wanner, H., 1953. Die Zusammensetzung des Siebröhrensaftes: Kohlehydrate. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **63**, 162.
- 1953. Enzyme der Glykolyse im Phloemsaft. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **63**, 201.
- Wiggins, L. F., Williams, J. H., 1952. Use of the *n*-Butanol—Formic acid—Water Mixture in the Paper Chromatography of Amino acids and Sugars. *Nature*, **170**, 279.
- Williams, K. T., Bevenue, A., 1951. A Simple Technique for the Identification of Raffinose and Sucrose by Enzymatic Hydrolysis on Paper Chromatograms and the Subsequent Separation of the Hydrolyzed Products by Paper Chromatography. *Science*, **113**, 582.
- Wolff, G. P., 1924. Zur vergleichenden Entwicklungsgeschichte und biologischen Bedeutung der Blütennektarien. *Bot. Arch.*, **8**, 305.
- Wykes, G. R., 1952. An Investigation of the Sugars Present in the Nectar of Flowers of Various Species. *The New Phytologist*, **51**, 210.
- 1953. The Sugar Content of Nectars. *Biochem. J.*, **53**, 294.
- Zimmermann, M., 1952. Über ein neues Trisaccharid. *Experientia*, **8**, 424.
-