

Zeitschrift: Botanica Helvetica
Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft
Band: 97 (1987)
Heft: 2

Artikel: Extracion, identification et dosage des sucres du pétiole de l'épinard (Spinacia oleracea cv. Nobel) pendant la variation de photopériode
Autor: Degli Agosti, Robert / Greppin, Hubert
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-67877>

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: 07.01.2026

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

Extraction, identification et dosage des sucres du pétiole de l'épinard (*Spinacia oleracea* cv. Nobel) pendant la variation de photopériode

Robert Degli Agosti et Hubert Greppin

Laboratoire de Physiologie végétale, Université de Genève, Pavillon des Isotopes, CH-1211 Genève 4, Suisse

Manuscrit accepté le 20 juillet 1987

Abstract

Degli Agosti R., and H. Greppin 1987. Extraction, identification and assay of sugars in Spinach (*Spinacia oleracea* cv. Nobel) petioles during photoperiodic acclimation. Bot. Helv. 97: 329–340.

Glucose, fructose and sucrose are the main soluble sugars present in spinach petioles. A rapid extraction method and a very sensitive (< 50 pmoles) assay are described. The soluble sugars content increases during the light phase of the short day (8 h light: 16 h dark) and decreases in darkness. If the length of a short day's light phase is extended, the glucose and fructose level rises dramatically (580% and 900, respectively). Sucrose and starch exhibit different stimulations.

Introduction

La lumière, outre son effet nutritionnel via la photosynthèse, est également une source de signaux pour la plante. Ainsi, la croissance, la différenciation et le développement peuvent être contrôlés par certaines longueurs d'ondes (rouge et rouge lointain, par exemple) captées par un pigment spécifique présent chez les végétaux: le phytochrome (Smith 1975, Pratt 1979, Shropshire et Mohr 1983 a, par ex.). De nombreux processus physiologiques (phototropisme, mouvements foliaires, mouvements des stomates, etc.) sont également contrôlés par un pigment absorbant dans le bleu: bleu/UV cryptochrome (Shropshire et Mohr 1983 b, Iino et al. 1985). De même, la durée de l'éclairement reçue chaque jour (photopériode) contrôle, chez certaines plantes, la mise à fleur (Vince-Prue 1975, Bernier et al. 1981, Halevy 1985). Ainsi, chez l'épinard (plante de jour long), la floraison ne s'observe que si l'éclairement journalier excède une certaine valeur critique (11 heures, Parlevliet 1966, Greppin 1975).

L'induction de la floraison est habituellement accompagnée d'une augmentation des sucres libres dans la plante (Bernier et al. 1981, Bodson et Bernier 1985). Curieusement, peu de recherches ont jusqu'à présent, été entreprises pour examiner en détail ce qu'il peut advenir de ces substances pendant cette période. Dans cet article nous décrivons les méthodes utilisées pour identifier et doser spécifiquement les sucres chez l'épinard. Nous présentons également les résultats du dosage de ces derniers lors

du jour court et pendant la variation (allongement) de la photopériode inductrice de la floraison.

Matériel et méthodes

Matériel

L'épinard (*Spinacia oleracea* c.v. Nobel), plante de jour long (Van Oorshoot 1960, Parlevliet 1986), est maintenu à l'état végétatif, grâce à une photopériode de jour court, dès le semis (8 heures de lumière et 16 heures d'obscurité). La lumière s'enclenche dès 08 h locale le matin et s'éteint à 16 h. La germination et la croissance sont obtenues dans des enceintes climatisées (phytotrons) où la température est maintenue constante à $20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, et l'humidité relative est de 70% ($\pm 5\%$) à la lumière et de 50% ($\pm 5\%$) à l'obscurité. L'éclairement lumineux diffusé par des tubes fluorescents (Sylvania «daylight» F40T12 de 40 watts) est de 6000 lux au niveau moyen des feuilles, ce qui correspond à une énergie de $20,6 \text{ W/m}^2$ (400–700 nm, Spectroradiomètre ISCO).

Extraction

L'extraction des sucres solubles s'effectue à partir de plantes de 4 semaines, en introduisant des segments (1 cm) de pétioles de feuilles primaires dans des tubes en verre contenant de l'éthanol à 80%. Le tube est fermé et soumis au bain-marie (100°C) pendant 15–30 min.

Dosage des sucres solubles totaux

Les extraits alcooliques sont partiellement purifiés (élimination de la chlorophylle, des glycoflavonoïdes, etc.) par filtration à travers une précolonne SEP PAK C18 (Waters Associates, Inc.).

Les sucres solubles totaux sont alors dosés au moyen de l'anthrone (Yemm et Willis 1954). L'absorption de la couleur qui se développe est immédiatement lue au spectrophotomètre (SP 1700 Ultraviolet Spectrophotometer, Phillips, Pye Unicam) à 630 nm et convertie en équivalent de glucose (μmole) grâce à une droite d'étalonnage établie avec du glucose pur.

Chromatographie en couche mince (C.C.M.)

La C.C.M. des sucres a été faite comme décrit par Gauch et al. (1979). L'extrait alcoolique est délicatement déposé sur une plaque d'aluminium recouverte de silica gel 60 (Merck, art. 5533). Celle-ci est placée dans une cuve à chromatographie Cammag. La phase mobile est un mélange d'acétonitrile/eau (85/15 V/V). La révélation des sucres se fait grâce à un réactif à base de thymol (0,5 g de thymol dans 95 ml d'éthanol 95% + 5 ml d' H_2SO_4 conc. p.a.), par vaporisation sur le chromatogramme séché. L'apparition de tâches colorées (rose-violet, suivant la nature du sucre) a lieu dans une étuve à 120°C pendant 5 à 10 minutes.

Chromatographie liquide à haute pression (H.P.L.C.)

Les analyses des sucres par H.P.L.C. ont été réalisées sur un appareillage de Tecator (5913 liquid chromatograph) équipé d'un détecteur de réfraction interférentiel à haute précision (5902 interference refractometer). Les conditions de chromatographie sont les suivantes: colonne nucléosil- NH_2 ($125 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); phase mobile: acétonitrile/eau (75/25 V/V); flux: $0,9 \text{ ml/min}$; température: 23°C ; volume d'injection: $40 \mu\text{l}$.

L'échantillon (extrait de pétioles d'épinard, 0,8 g poids frais: P.F., dans 8 ml d'éthanol 80%) est évaporé à sec au rotavapor, puis repris par de l'eau. La chlorophylle est éliminée par passage sur une colonne SEP PAK C18. A nouveau évaporé à sec à 70°C , l'extrait est dissout dans de l'eau, puis dans l'acétonitrile (conc. finale 75%) avant d'être injecté.

Dosage du glucose et du fructose

La mesure spécifique du glucose dans l'extrait alcoolique s'effectue au moyen d'une technique enzymatique utilisant l'hexokinase (HK, Boehringer Mannheim) et la glucose 6-P-déshydrogénase

(G6PDH, Boehringer Mannheim) selon le principe suivant (Bergmeyer et al. 1974):

1. hexose + ATP \xrightarrow{HK} hexose-6-P + ADP (hexose = glucose, fructose, etc.)
2. glucose-6-P + $NADP^+$ $\xrightarrow{G6PDH}$ gluconate-6P + $NADPH + H^+$

La fluorescence due à l'augmentation du cofacteur NADPH est mesurée par un spectrofluorimètre (Aminco-Bowman Spectrofluorimeter équipé d'un photon-counter Aminco) après lecture des valeurs sur un enregistreur (Linear recorder, Linear Instr. Corp.). La longueur d'onde d'excitation est de 340 nm et celle d'émission de 480 nm.

Le dosage du fructose (Bernt et Bergmeyer 1974) est réalisé après celui du glucose au moyen de l'adjonction dans le même milieu réactionnel de l'enzyme phosphoglucose isomérase (PGI, Boehringer Mannheim) qui catalyse la réaction suivante:

3. fructose-6-P \xrightarrow{PGI} glucose-6-P

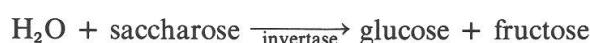
Le milieu de réaction pour la mesure par fluorescence est le suivant: au tampon (TRIS-HCl 0,05 M, $MgCl_2$ 2 mM à pH 8,1, ATP 0,3 mM, $NADP^+$ 0,05 mM), qui contient l'enzyme G6PDH (0,7 U/ml) est ajouté l'extrait à doser. La fluorescence endogène est mesurée (zéro) et les réactions enclenchées par l'adjonction de l'HK (conc., 3,5 U/ml). Dans les conditions le dosage se termine après 3 à 5 min. Le fructose peut alors être détecté dans la même cuvette en ajoutant la PGI (3,5 U/ml concentration finale: c.f.).

La quantité de glucose et de fructose est calculée grâce à une droite d'étalonnage de la fluorescence (fig. 1).

Tout le glucose des pétioles est solubilisé lors de la première extraction. On n'observe aucune différence dans la quantité de glucose dosée si l'on utilise une extraction à froid (broyage au potter 0–2 °C). Enfin, l'adjonction d'une quantité connue de glucose avant l'extraction se retrouve au dosage, ce qui montre qu'il n'y a pas dégradation de ce sucre dans le milieu utilisé.

Dosage du saccharose

La mesure du saccharose s'effectue par dosage du glucose produit après action de l'invertase, à pH acide, sur le saccharose:

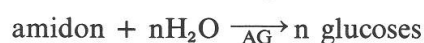


Le glucose (et fructose) présent dans l'extrait interfère avec ce test. Il se révèle donc indispensable de détruire ces hexoses avant de doser le saccharose. Ceci se réalise au moyen d'une incubation dans un milieu fortement alcalin où les sucres réducteurs (glucose, fructose) sont très instables par rapport aux sucres non réducteurs tels que le saccharose (van Handel 1968).

La figure 2 montre la destruction du glucose dans une solution de NaOH 0,1 M et le dosage correct du saccharose qui y est lié. La procédure finalement adoptée tient compte des variations de pH nécessaires et est la suivante: l'extrait alcoolique est évaporé à sec (95 °C), du NaOH 0,1 M est ajouté avec une incubation à 95 °C pendant 5 min. L'invertase (β -fructosidase, Boehringer Mannheim, c.f. 50 U/ml) dissoute dans un tampon Na-acétate (0,1 M, pH 4,5) est ajoutée. Après 20 min à température ambiante l'hydrolyse du saccharose est totale. Le pH est ensuite réajusté à 8,1 avec du TRIS 2 M. Le glucose produit étant dosé suivant la procédure décrite précédemment. L'étalonnage de la fluorescence suivant cette méthode donne les mêmes résultats que ceux de la figure 1. Dans tous les cas testés la production de glucose est équimolaire à celle du fructose. L'adjonction d'une quantité connue de saccharose avant l'extraction se retrouve totalement au dosage dans ces conditions.

Dosage de l'amidon

Le principe du dosage est fondé sur l'hydrolyse enzymatique de l'amidon par l' α -myloglucosidase (AG) qui libère quantitativement du glucose:



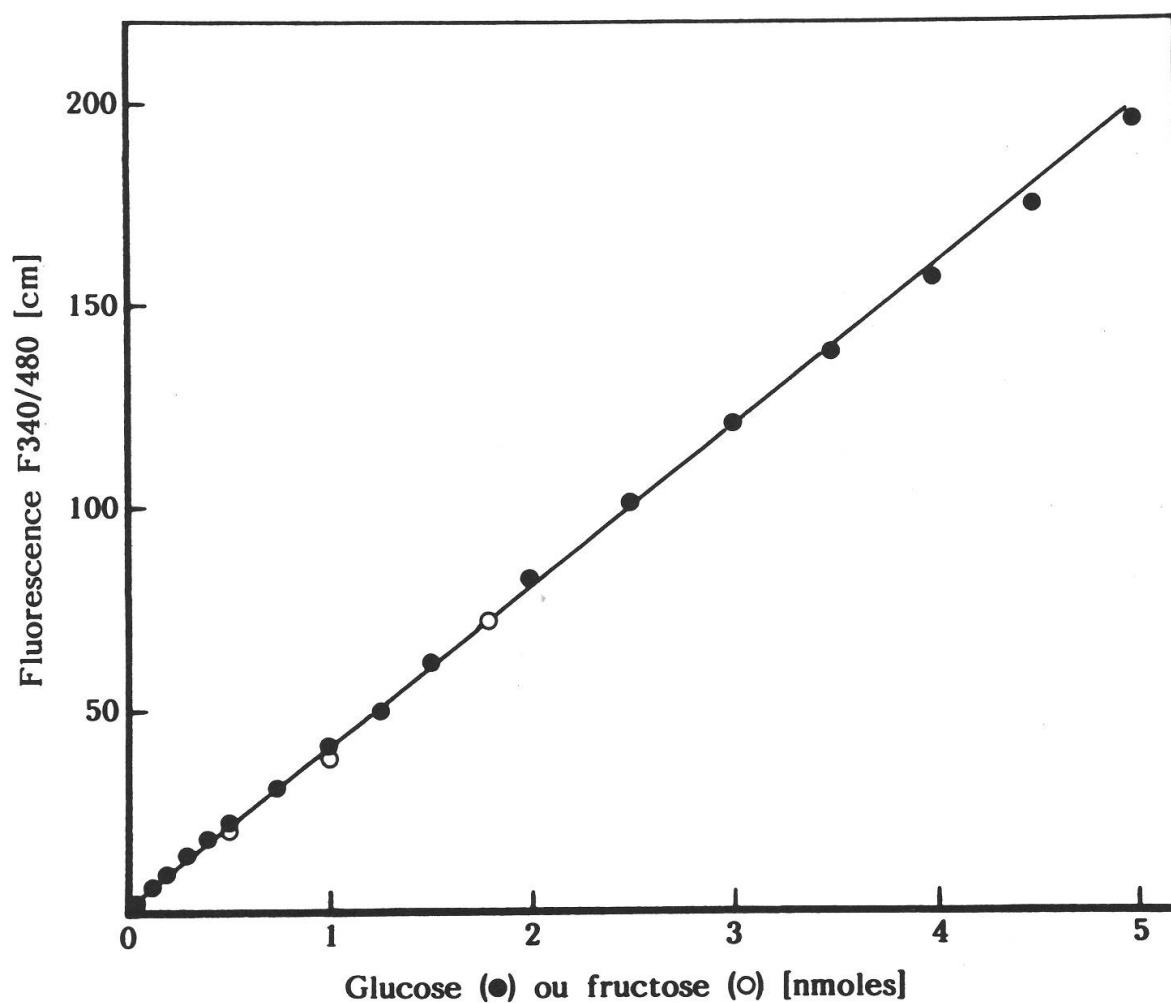


Fig. 1. Courbe d'étalonnage de la fluorescence due au NADPH et correspondant au glucose (●) et au fructose (○).

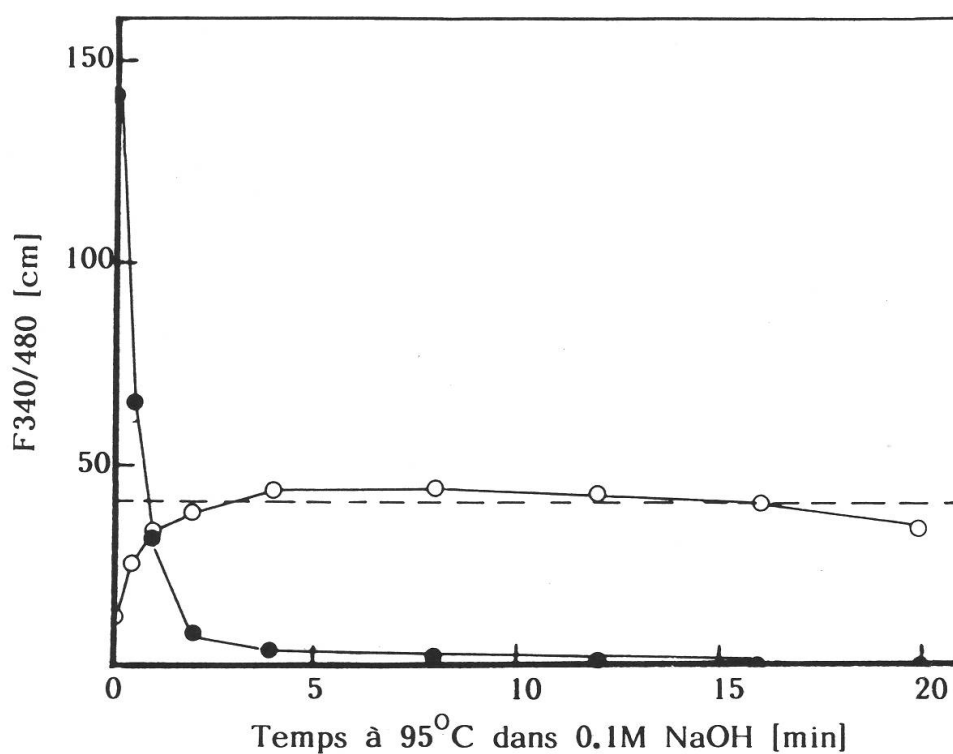


Fig. 2. Dosage du saccharose (○) et destruction du glucose (●) dans un mélange de glc/saccharose de 4/1. Le niveau de saccharose théorique est représenté en traits interrompus.

Cette hydrolyse se déroule en milieu acide (pH 4,5) et est très spécifique sur des extraits hétérogènes pour autant que l'AG soit exempte d'activité β -glucanase qui hydrolyse le callose et la cellulose (MacRae 1971). Jones (1979) a examiné la pureté de différentes préparations commerciales disponibles, dont une seule (glucoamylase de *Rhizopus niveus*, *Rh. delemar*, Miles Laboratories, Ltd.) s'est avérée adéquate.

La procédure utilisée est la suivante: les tissus sont épuisés en glucose par 3 extractions successives (éthanol 80%, à chaud), pour éviter toute contamination par du glucose soluble. L'amidon est gélatinisé (solubilisation) dans ces tissus par incubation au bain-marie (100 °C) pendant 1 heure (tampon Na-acétate 0,05 M, pH 4,5). Le broyage s'effectue alors au potter dans le même tampon en ajoutant l'AG (c.f. 0,033 mg/ml, Miles Lab. Ltd.) et de l'azide (NaAzide, c.f. 0,015%) pour prévenir la croissance de bactéries. Les échantillons sont incubés à 40 °C pendant 16 heures. Le glucose libéré est ensuite dosé au fluorimètre. L'hydrolyse est très complète, car l'adjonction d'une solution d'iode (2 g KI, 1 g I₂ dans 300 ml d'eau) ne donne aucune coloration (examen microscopique).

Résultats

En jour court, la teneur des sucres solubles totaux du pétiole de l'épinard augmente pendant la phase lumineuse et diminue à l'obscurité (fig. 3). Le prolongement de la phase lumineuse dès 16 heures de l'après-midi (traitement appelé transfert) se traduit par une augmentation marquée. On observe en effet que sur un intervalle de temps identique (8 heures) l'augmentation entre 16 et 24 heures est pratiquement le double de celle entre 08 et 16 heures (fig. 3).

L'analyse par C.C.M. des extraits à 16 heures et à 24 heures, lors d'un transfert, montre qu'il n'y a pas de variation qualitative, mais qu'il s'agit bien d'une aug-

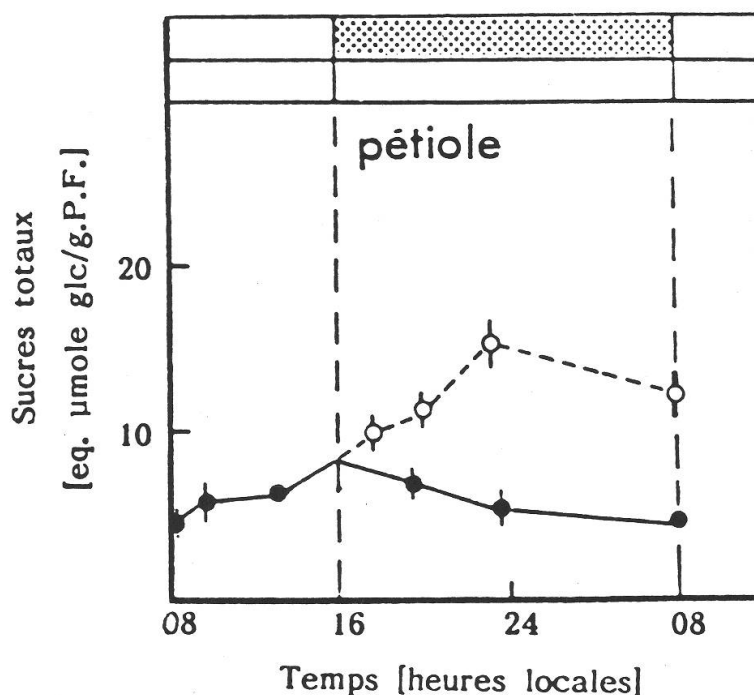


Fig. 3. Evolution des sucres solubles totaux dans le pétiole de l'épinard en jour court (●) et lors du transfert en lumière continue (○). Plantes âgées de 4 semaines.

mentation quantitative (fig. 4). La C.C.M. indique d'autre part que les principaux sucres solubles présents sont le glucose, le fructose et le saccharose (fig. 4).

L'identification est fondée sur les R_g (distance de migration de x/distance de migration du glucose) et sur une analyse enzymatique (fig. 4): l'extrait à 16 heures (spot no. 3) traité par de l'invertase (20 °C, 5 min, 150 U/ml) fait disparaître la tâche correspondant au saccharose au profit de celle du glucose et du fructose (spot no. 4). On observe le même résultat si l'on traite un extrait de plantes transférées (spot no. 5) avec le même enzyme (spot no. 6).

Si l'on traite l'échantillon du spot no. 5 avec une solution contenant de l'ATP et de l'HK (TRIS 0,01 M, 2 mM MgCl₂, 2 mM ATP pH 8,1, HK 13 U/ml, 10 min, 20 °C). Le fructose et le glucose sont phosphorylés en fructose 6-P et glucose 6-P alors que le saccharose reste inchangé (spot no. 7).

De plus, l'examen des produits d'hydrolyse par l'invertase d'un extrait de cette plante, laisse apparaître, après dosage enzymatique, une quantité égale de glucose et de fructose, confirmant ainsi la présence de saccharose.

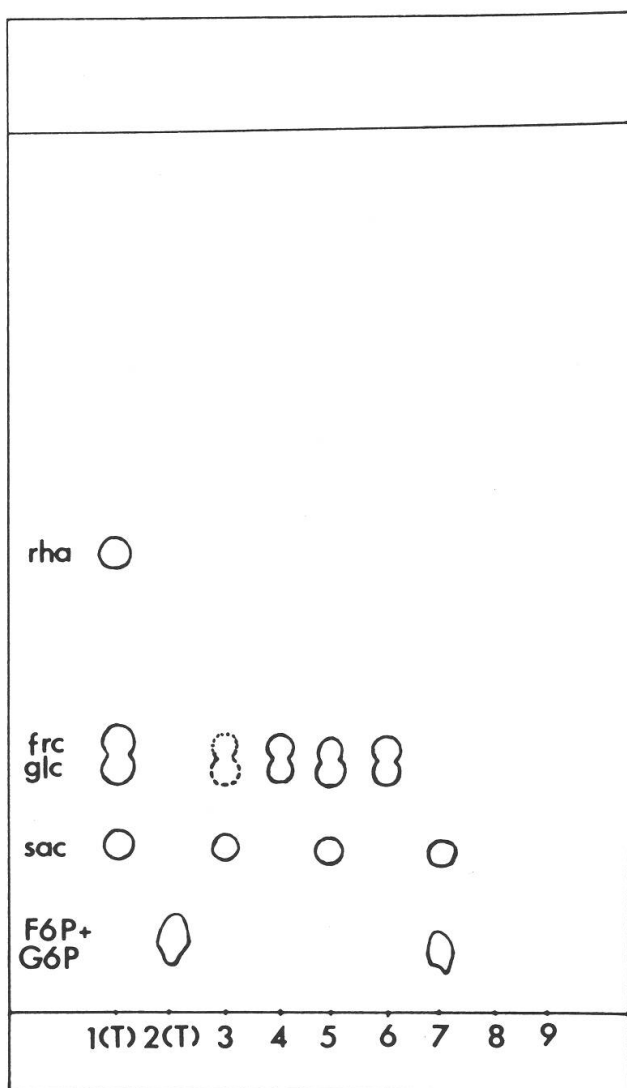


Fig. 4. C.C.M. d'extraits à l'éthanol 80% de pétioles d'épinard. (1): sucres témoins, dans l'ordre ascendant: saccharose (sac), glucose (glc), fructose (frc) et rhamnose (rha). (2): glucose-6-phosphate (G6P) et fructose-6-phosphate (F6P) dans un tampon TRIS 0,01 M. (3): extrait à 16 h. (4): le même extrait traité à l'invertase. (5): extrait de plantes transférées. (6): le même extrait traité avec de l'invertase. (7): extrait no. 5 traité avec une solution contenant de l'ATP et de l'HK. (8): témoin invertase sans extrait. (9): témoin HK sans extrait. Noter que les tâches en pointillés représentent des colorations moins intenses que les traits pleins.

La nature des sucres libres chez l'épinard est confirmée par HPLC (fig. 5 A–B). Bien que de nombreuses autres substances soient présentes, et que la méthode de détection ne soit pas assez sélective (indice de réfraction), il est possible d'identifier très spécifiquement la nature des substances variant lors d'un transfert en lumière continue, en calculant le rapport des indices de réfraction de chromatogrammes des plantes transférées (T22) à l'indice de celles de 16 heures (JC 16) considérées comme référence (fig. 6). Il est ainsi possible de montrer que seuls les pics correspondant au fructose, au glucose et au saccharose, identifiés au moyen des temps de rétention respectifs, ont varié quantitativement. Qualitativement aucune différence n'est observable dans ces chromatographies. L'augmentation durant le transfert, calculée sur la base du chromatogramme standard et relativement à 16 heures, est de 66% pour le saccharose, 333% pour le fructose et 507% pour le glucose. Ces variations sont considérables.

Les résultats des analyses enzymatiques sont représentés dans la figure 7. En jour court la teneur de tous les sucres examinés chez le pétiole de l'épinard augmente pendant la lumière et diminue à l'obscurité.

Le transfert photopériodique provoque des augmentations très brusques et spectaculaires du glucose et du fructose. En revanche le saccharose et l'amidon semblent augmenter plus régulièrement. En effet, si l'on compare la teneur des sucres pour une même durée de temps (8 heures) mais sur la période de 16 à 24 heures comparée à celle de 08 à 16 heures, on obtient, en transfert, les augmentations suivantes: glucose: 580%, fructose: 900%, saccharose: 120% et amidon: 130%. A titre de comparaison l'augmentation des sucres totaux, lors d'un transfert (fig. 3), suivant le même rapport est de 210%. Autrement dit, entre 16 et 20 heures la teneur en glucose augmente 5,8 fois plus qu'entre 08 et 16 heures, il en est de même pour le fructose (9×). Le saccharose (1,2×), l'amidon (1,3×) et les sucres totaux (2,1×) évoluent plus lentement.

Conclusion

L'extraction des sucres solubles, par l'éthanol 80% à chaud permet, de par sa simplicité, d'obtenir facilement un grand nombre d'échantillons stables et possède donc un intérêt méthodologique certain. Il en va de même pour le dosage enzymatique dont la sensibilité pour le glucose et le fructose atteint aisément 50 pmoles. Le dosage du saccharose nécessite la destruction préalable du glucose et du fructose.

Le dosage à l'anthrone donne une mesure globale des sucres, toutefois des variations considérables de quelques sucres peuvent être masquées par la présence d'autres molécules réagissant à l'anthrone et présentes en plus grande quantité.

Du point de vue biologique les résultats indiquent que chez l'épinard, les sucres solubles totaux s'accumulent en présence de lumière et diminuent à l'obscurité. Cette dynamique est en harmonie avec les fonctions de la photosynthèse, processus dépendant de la lumière et qui, grâce à cette dernière assure la fixation du carbone atmosphérique dans des molécules stables telles les sucres. Cette fluctuation journalière des sucres solubles a déjà été observée (Kakie et Sugizaki 1970, Sicher et al. 1984, par ex.). Cependant, très peu de chercheurs se sont intéressés à suivre en détail la cinétique des sucres immédiatement lors du transfert photopériodique. Seul Bodson (1977) a entrepris une telle recherche chez la moutarde (plante de jour long), mais en n'examinant que les sucres solubles totaux et l'amidon. Cet auteur s'est limité à constater que «... le contenu des sucres solubles et de l'amidon (dans les feuilles) augmente dès la prolongation de la phase lumineuse...» (par rapport à l'obscurité), et plus loin «... ces aug-

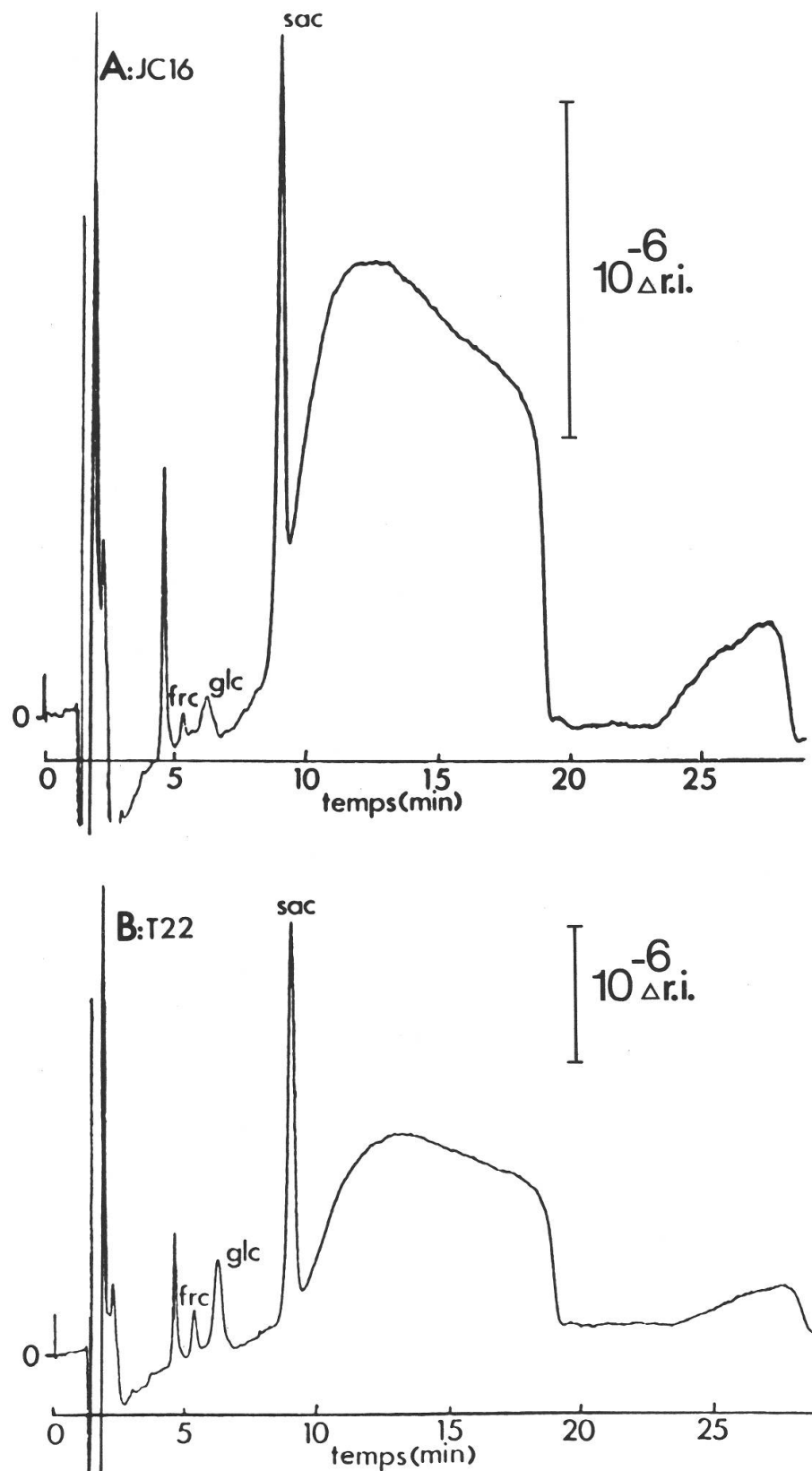


Fig. 5. Chromatograms (HPLC) d'extraits de pétioles d'épinard. A: extrait de jour court à 16 heures (JC 16). B: extrait de transfert à 22 h (T22, 6 heures de lumière supplémentaire). Noter la différence d'échelle entre A et B.

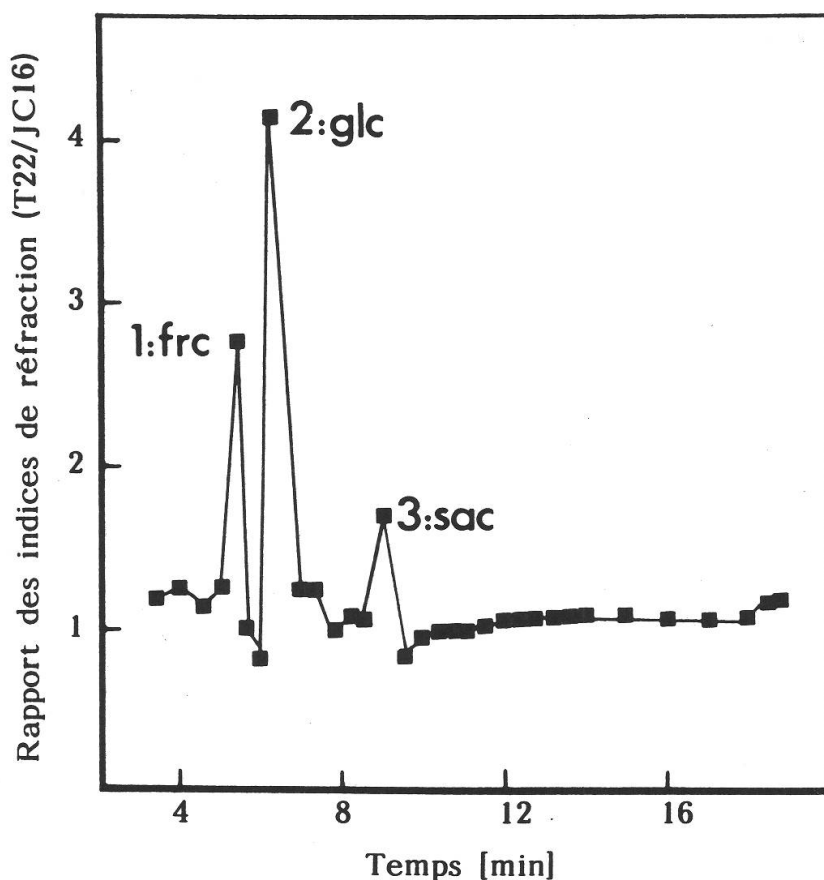


Fig. 6. Rapport des indices de réfraction du chromatogramme d'extrait de pétioles d'épinard à 22 heures (transfert) à celui de 16 heures (jour court). (1): fructose. (2): glucose. (3): saccharose.

mentations ne sont pas surprenantes, car la durée journalière de lumière photosynthétique a été considérablement étendue.» Toutefois lorsqu'on examine ces données plus en détail (Degli Agosti 1985), on observe aussi une augmentation brusque vers 16 heures de lumière totale reçue.

Ces résultats vont donc dans le même sens que ceux obtenus dans le pétiole et la feuille (Degli Agosti 1985) de l'épinard lors d'un transfert: à savoir, une élévation du contenu en sucres solubles totaux aux environs de la photopériode critique, un peu supérieure à celle à laquelle il serait vraisemblable de s'attendre sur la base d'une production plus ou moins linéaire due au fonctionnement de la photosynthèse, et donc, a priori, linéaire ou saturant pour les sucres. En fait, à partir d'une période critique cette évolution présente un brusque changement de pente.

Les techniques de chromatographie en couche mince et d'HPLC ont mis en évidence, chez l'épinard la présence de 3 sucres solubles libres: le saccharose, le glucose et le fructose. Leur évolution pendant le jour court montre une fluctuation typique dépendante de la lumière et qui est semblable à celle qui est normalement décrite dans la littérature (Chatterton et Silvius 1979, Gordon et al. 1982, Delrot et al. 1983, Rufty et al. 1983, Huber et al. 1984, Robinson 1984, Sicher et al. 1984). A l'exception de Delrot et al. (1983), Rufty et al. (1983) et Sicher et al. (1984), tous les autres auteurs cités ont examiné des plantes maintenues dans différentes photopériodes (jour court, in-

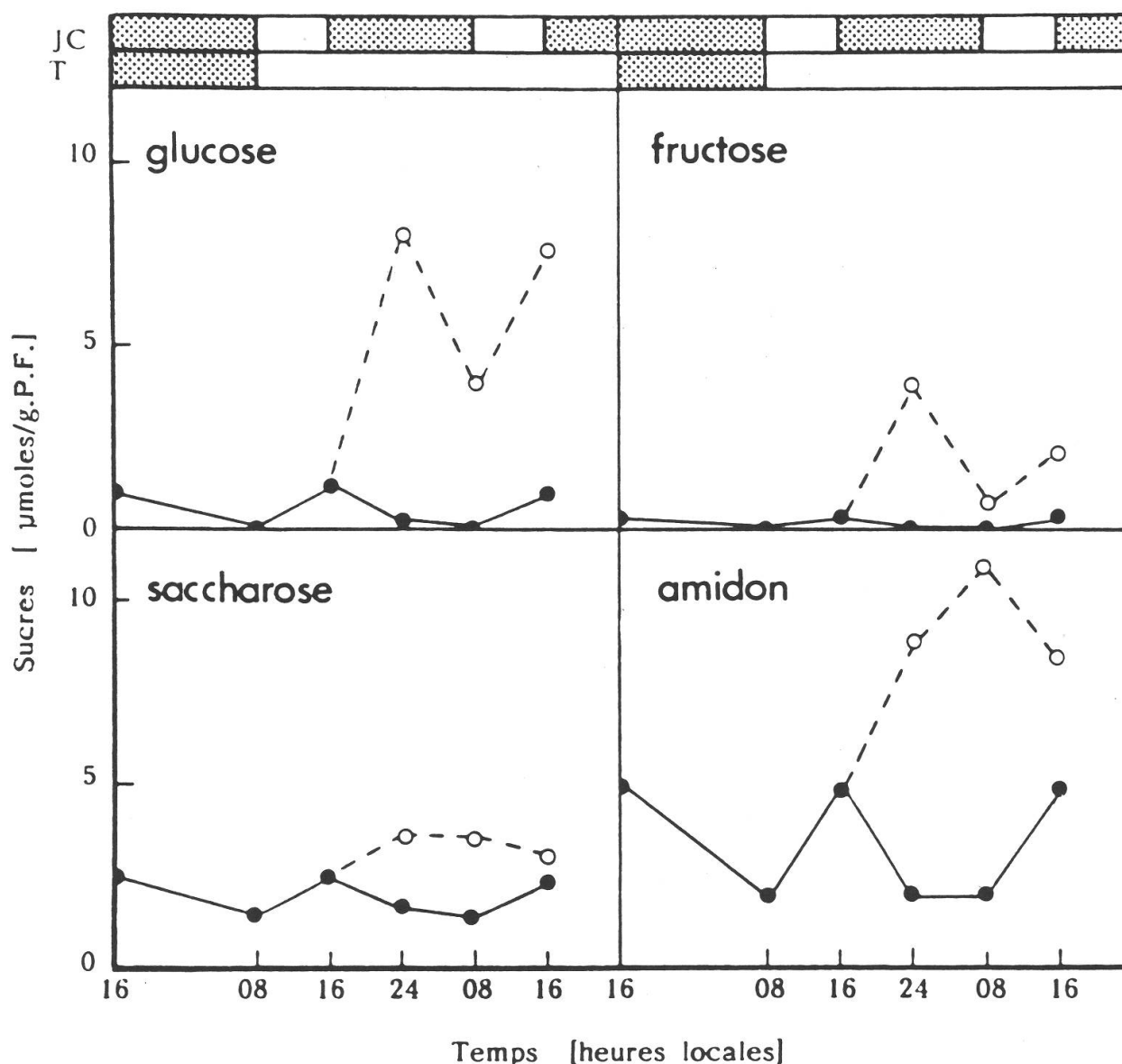


Fig. 7. Evolution de la teneur en différents sucres chez le pétiole de l'épinard soumis à une alternance de jour court (JC; ●) et lors du transfert (T; ○).

termédiaire et jour long), mais aucun n'a suivi en détail la dynamique des différents sucres lors de l'allongement même de cette photopériode (Degli Agosti 1985).

Les résultats présentés montrent clairement que le glucose et le fructose (sucres métaboliques) augmentent très brusquement dans le pétiole de l'épinard en transfert au-delà de 16 heures. En revanche, les sucres de transport (saccharose) et de réserve (amidon) ne présentent pas un tel phénomène.

Nous remercions très vivement M. R. Bürer de Instrumenten-Gesellschaft pour l'analyse des sucres par HPLC et Mme J. Kroese pour son aide technique.

Résumé

Les principaux sucres solubles présents dans les pétioles d'épinard sont le glucose, le fructose et le saccharose. Une technique d'extraction rapide et une méthode enzymatique très sensible (< 50 pmoles) a permis de les doser spécifiquement. Leur teneur augmente pendant la phase lumineuse du jour court (8 h de lumière: 16 h obscurité), puis diminue à l'obscurité. Lorsque la phase lumineuse est prolongée, on observe une augmentation spectaculaire des sucres métaboliques tels que le glucose (580%) et le fructose (900%). En revanche, le saccharose et l'amidon semblent augmenter régulièrement.

Bibliographie

- Bergmeyer H. U., Bernt E., Schmidt F. and Stork H. 1974. In: Methods of enzymatic analysis (H. U. Bergmeyer ed.) D-glucose. Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Vol. 3: 1188–1193.
- Bernier G., Kinet J. M. and Sachs R. M. 1981. The physiology of flowering, II, CRC Press, Boca Raton, 231 pp.
- Bernt E. and Bergmeyer H. U. 1974. In: Methods of enzymatic analysis (H. U. Bergmeyer ed.) D-Fructose. Vol. 3: 1304–1307.
- Bodson M. and Bernier G. 1985. Is flowering controlled by assimilate level? *Physiol. Vég.* 23: 491–501.
- Bodson M. 1977. Changes in the carbohydrate content of the leaf and the apical bud of *Sinapis* during transition to flowering. *Planta* 135: 19–23.
- Chatterton N. J. and Silvius J. E. 1979. Photosynthate partitioning into starch in Soybean leaves I. Effects of photoperiod versus photosynthetic period duration. *Plant Physiol.* 64: 749–753.
- Degli Agosti R. 1985. Etude du contenu en sucres de l'épinard (*Spinacia oleracea* cv. Nobel) et d'autres plantes, pendant la variation de la photopériode. Thèse No. 2174. Université de Genève, 232 pp.
- Delrot S., Faucher M., Bonnemain J.-L. and Bonmort J. 1983. Nycthemeral changes in intracellular and apoplastic sugars in *Vicia faba* leaves. *Physiol. Vég.* 21: 459–467.
- Gauch R., Leuenberger U. and Baumgartner E. 1979. Quantitative determination of mono-, di- and trisaccharides by thinlayer chromatography. *J. Chromatogr.* 174: 195–200.
- Gordon A. J., Ryle G. J. A., Mitchell D. F. and Powell C. E. 1982. The dynamics of carbon supply from leaves of barley plants grown in long or short days. *J. Exp. Bot.* 33: 241–250.
- Greppin H. 1975. La floraison: ébauche d'une nouvelle stratégie. *Saussurea* 6: 245–252.
- Halevy A. H. (ed.) 1985. CRC Handbook of flowering. 4 vol. CRC Press, Boca Raton.
- Handel E. van 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.* 22: 280–283.
- Huber S. C., Rufty T. W. and Kerr P. S. 1984. Effect of photoperiod on photosynthate partitioning and diurnal rhythms in sucrose phosphate synthase activity in leaves of soybean and tobacco. *Plant Physiol.* 75: 1080–1084.
- Iino M., Ogawa T. and Zeiger E. 1985. Kinetic properties of the blue-light response of stomata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8019–8023.
- Jones M. G. K. 1979. An enzymic microassay for starch. *Plant, Cell & Environment* 2: 227–234.
- Kakie T. and Sugizaki Y. 1970. Diurnal changes in the starch and sugars of tobacco leaves. *Soil Sci. and Plant Nutr.* 16: 201–203.
- MacRae J. C. 1971. Quantitative measurement of starch in very small amounts of leaf tissue. *Planta* 96: 101–108.
- Oorshoot J. L. P. van 1960. Effects of daylength upon growth and development of spinach (*Spinacia oleracea*). *Meded. Landbouwhogeschool, Wageningen* 60: 1–10.
- Parlevliet J. E. 1966. The influence of external factors on the growth and development of spinach cultivars (*Spinacia oleracea* L.). *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen* 67: 1–76.

- Pratt L. H. 1979. Phytochrome: function and properties. *Photochem. Photobiol. Rev.* 4: 59–124.
- Robinson J. M. 1984. Photosynthetic carbon metabolism in leaves and isolated chloroplasts from spinach plants grown under short and intermediate photosynthetic periods. *Plant Physiol.* 75: 397–409.
- Rufty T. W. Jr., Kerr P. S. and Huber S. C. 1983. Characterisation of diurnal changes in activities of enzymes involved in sucrose biosynthesis. *Plant Physiol.* 73: 428–433.
- Shropshire W. Jr. and Mohr H. (eds.) 1983 a. *Encyclopedia of plant Physiology*, N.S., vol. 16 A: Photomorphogenesis. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, p. 1–456.
- Shropshire W. Jr. and Mohr H. (eds.) 1983 b. *Encyclopedia of plant Physiology*, N.S., vol. 16 B: Photomorphogenesis. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, p. 457–832.
- Sicher R. C., Kremer D. F. and Harris W. G. 1984. Diurnal carbohydrate metabolism of barley primary leaves. *Plant Physiol.* 76: 165–169.
- Smith H. 1975. *Phytochrome and Photomorphogenesis*. London: McGraw-Hill, 235 pp.
- Vince-Prue D. 1975. *Photoperiodism in plants*. McGraw-Hill, London, 444 pp.
- Yemm E. W. and Willis A. J. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* 57: 508–514.