

Gluconeogenese in reifenden Beeren von *Vitis vinifera*

von

H. P. RUFFNER, W. KOBLET und DORA RAST

Gluconeogenesis in the ripening fruit of *Vitis vinifera*

Summary. — Fumaric acid-2,3-¹⁴C was applied to grape berries at weekly intervals and the incorporation of radioactivity into other acids and the neutral, water-soluble substances determined. Malic acid, predominantly labelled in the inner C-atoms, proved to be the main metabolic product, and up to 17% of the ¹⁴C-activity of the extract was discovered in the neutral fraction. The ¹⁴C-glucose thus synthesized carried more label in the C1/C2 and the C6/C5 positions than in the two central C-atoms. Based on these results it is concluded that the ripening fruit transforms acids into sugars by reactions involving a formal reversal of the glycolytic pathway.

Incorporation of radioactivity of ¹⁴C-fumaric and -malic acids into sugars shows a temperature optimum of about 20 °C. Comparisons between the sugar concentrations of grapes growing in the sun or in the shade, indicate that the rate of sugar synthesis during the final ripening-stages is greater in the shade. Thus, the marked difference in sugar content at veraison disappears during maturation. The contribution of sugar synthesis from acids to the observed compensation is discussed.

Einleitung

Die bisherigen Arbeiten über die Transformation von Säuren in Zucker (Gluconeogenese) bei grünen Pflanzen beschränken sich im wesentlichen auf die Untersuchung dieses Vorganges während der Samenkeimung (BENEDICT und BEEVERS 1961, CANVIN und BEEVERS 1961, OAKS und BEEVERS 1964, THOMAS und AP REES 1972). Verschiedene Beobachtungen deuten jedoch darauf hin, daß die Fähigkeit zur Gluconeogenese nicht ein nur bei der Mobilisierung von Fettsäuren auftretendes Phänomen zu sein braucht. So wird in *Chlorella* nach Applikation von ¹⁴C-Pyruvat radioaktive Saccharose synthetisiert (OAKS 1962), und auch die von Weintrauben bekannten Veränderungen im Zucker- und Säuregehalt (Lit. zit. in HULME 1971), die während der Reifephase (GEISLER und RADLER 1963) typisch gegenläufige Kurven ergeben (COLAGRANDE 1959, KLIEWER und SCHULTZ 1964, KLIEWER 1966, 1968, HALE 1968 u. a.), lassen es als möglich erscheinen, daß hier ein Mechanismus realisiert ist, der erlaubt, akkumuliertes Malat wieder in den Kohlenhydratsstoffwechsel einzubeziehen. Einen Hinweis in diese Richtung geben ferner die Untersuchungen von DRAWERT und STEFFAN (1966), STEFFAN (1968) sowie RAPP *et al.* (1971), die in reifenden Beeren eine Bildung von Zuckern aus ¹⁴C-Äpfelsäure nachweisen konnten. Daraus darf man allerdings nicht direkt auf die Existenz eines Zuckersyntheseweges in der Art einer „rückwärtslaufenden“ Glykolyse (RIBÉREAU-GAYON und RIBÉREAU-GAYON 1969, DRAWERT 1971) schließen, da die Äpfelsäure u. U. in beträchtlichem Maße veratmet wird (RAPP *et al.* 1971) und somit die Möglichkeit einer Refixierung des respiratorischen CO₂ über den Calvinzyklus nicht zu eliminieren ist. Schließlich kann man auch den in Trauben zeitlich mit dem Einsetzen des Säureabbaus korrelierten beträchtlichen Anstieg der Malatdehydrogenase-Aktivität (HAWKER 1969) so interpretieren, daß erst dadurch die für eine Zuckerbildung über Oxalacetat und Phosphoenolpyruvat erforderliche Ausgangsstoffkonzentration erreicht wird.

Ein tieferer Einblick in den Mechanismus der Gluconeogenese *in vivo* ist nur durch Einführung von spezifisch markierten Präkursoren und darauffolgende Bestimmung des Markierungsmusters im Zielmolekül zu gewinnen. Dabei ist unbedingt eine relativ kleine Zeitspanne zwischen Fütterung und Analyse (kurze „metabolic time“) einzuhalten, da durch andere Stoffwechselforgänge, insbesondere Decarboxylierungen und Refixierungen von markiertem CO_2 , sehr rasch eine Randomisierung der Aktivitätsverteilung in den Präkursormolekülen eintreten kann, wodurch bei Langzeitversuchen genaue Aussagen über Ablauf und Bedeutung der untersuchten Synthesekette unmöglich gemacht werden. Die vorliegende Arbeit trägt diesen Gegebenheiten Rechnung und soll damit einen Beitrag zum Verständnis des Reifeprozesses der Weintraube leisten.

Material und Methoden

Pflanzenmaterial: Die Tracerversuche wurden mit vierjährigen Blauburgunder-Freilandreben (Klon Mariafeld auf 5C Geisenheim) der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil, die Bestimmungen der Zucker- und Säuregehalte von sonnenexponierten Früchten resp. Schattentrauben mit Beerenproben von achtjährigen Riesling \times Silvaner (auf 3309C) durchgeführt.

Applikation des Tracers: Fumarsäure-2,3- ^{14}C (Amersham, CFA 143; 1,7 μM , 100 μC) wurden in 220 μl H_2O gelöst und zu gleichen Teilen in 20 Beeren eines Fruchtstandes *in situ* eingespritzt. Eintauchen der in Plastiksäcke eingepackten Trauben in ein thermostatisiertes Wasserbad (30 $^\circ\text{C}$, falls keine andere Angabe) garantierte die Aufrechterhaltung konstanter Temperaturverhältnisse während der ganzen Einbauperiode (6 Stunden). Nachher ernteten wir die so behandelten Beeren und ergänzten die Proben mit Material derselben Rispe auf 25 g.

Herstellung und Aufarbeitung der Extrakte: Die Extrakte wurden nach folgendem Verfahren hergestellt: (1) Beeren während 2 min in 100 ml siedendem Äthanol abs. homogenisieren. Filtrieren. (2) Rückstand mit 100 ml heißem Äthanol 80% nachextrahieren. Filtrieren. (3) Filtrate vereinen und im Rotationsverdampfer bei 40 $^\circ\text{C}$ zur Trockne bringen. (4) Rückstand in 100 ml Methanol 30% aufnehmen und Lipide mit Petroläther extrahieren bis Überstand farblos. (5) Wässrige Phase eindampfen und den trockenen Rückstand in 10 ml Äthanol 20% aufnehmen. (6) Unlösliches Material durch Zentrifugieren entfernen.

Die Auftrennung des Extraktes wurde an zwei hintereinandergeschalteten Säulen mit Dowex 50W-X8 (H^+ -Form) und Dowex 1-X8 (Formiat-Form) durchgeführt (für Details vgl. CANVIN und BEEVERS 1961). Elution der organischen Säuren aus der Anionenaustauschersäule erfolgte mit 4n Ameisensäure. Aus dieser Fraktion wurde die Äpfelsäure durch Chromatographie an Dowex 1-X8 (HCOO^- , 200/400 U.S. mesh) isoliert (vgl. BUSCH *et al.* 1952) und anschließend papierchromatographisch gereinigt (s. unten).

Bestimmung der Zucker- und Säurekonzentration von Beeren: Die Messung des Zuckergehaltes erfolgte aräometrisch mit einer Bosch-Waage, diejenige der Säurekonzentration durch Titration mit 0,1 n NaOH.

Dünnschichtchromatographie: Auftrennung der Säurefraktion nach TANNER und SANDOZ (1972) an Cellulose MN 300 unter Verwendung von Butanol/Ameisensäure/ H_2O (4 : 2 : 5) als Fließmittel.

Papierchromatographie: Es wurde stets mit säuregewaschenem Schleicher & Schuell-Papier der Sorte 2040b gearbeitet. Die Reinigung der Äpfelsäurefraktion (s. oben) erfolgte durch Chromatographie mit Butanol/Ameisensäure/ H_2O

(4 : 1 : 5), Elution und Rechromatographie mit wassergesättigtem Phenol, enthaltend 1% Ameisensäure. Zur Auftrennung der Neutralfraktion diente Äthylacetat/Eisessig/H₂O (3 : 1 : 3). Hieraus wurden die zur Ermittlung des Markierungsmusters bestimmten Glucoseproben (s. unten) durch Elution und nochmaliges Chromatographieren im gleichen Laufmittel gewonnen. Die Lokalisierung der Zucker erfolgte durch Entwickeln mit Silbernitrat (TREVELYAN *et al.* 1950) bzw. durch ¹⁴C-Scanning der Chromatogramstreifen.

Bestimmung des ¹⁴C-Markierungsmusters: (a) Äpfelsäure: Oxydative Decarboxylierung mit KMnO₄ (ARONOFF 1956). In einer Testanalyse mit Äpfelsäure-4-¹⁴C wurde die Radioaktivität zu 97,5% in der erwarteten Position gefunden. (b) Glucose: Homofermentative Vergärung des Zuckers durch *Lactobacillus casei* (La 703) und Oxydation der entstandenen Milchsäure zu Acetaldehyd und CO₂ (vgl. ebd.).

Radioaktivitätsmessungen: (a) Mit einem Szintillationszähler (Nuclear Chicago Unilux II): Das Medium für wässrige Proben bestand aus einem Gemisch von 2400 ml Toluol, 1512 ml Aethanol, 16 g PPO, 60 mg POPOP und 145 g Aerosil, dasjenige für Ausschnitte aus Papierchromatogrammen (5 mm × 40 mm) aus einer Lösung von 0,5% PPO und 0,03% POPOP in Toluol. Für mehr Details vgl. RUFFNER (1973). (b) Mit einem Chromatographie-Scanner (Berthold Typ II): Die ¹⁴C-Aktivität auf Dünnschicht- und Papierchromatogrammen wurde mit endfensterlosen Gasstrom-Proportionalzählrohren (Methan; 2700 V) und einem Dual-Ratemeter-Integrator (Berthold LB 242 K) bestimmt.

Ergebnisse

1. Nachweis der Gluconeogenese

Die Leichtigkeit, mit welcher *in vivo* aus Malat resp. aus mit diesem im Gleichgewicht stehendem Oxalacetat CO₂ abgespalten und dann durch verschiedene Reaktionen refixiert werden kann, verbietet eine Untersuchung des Mechanismus der Gluconeogenese anhand von carboxylmarkierter Äpfelsäure, weil hierbei in kurzer Zeit Randomisierung des ¹⁴C im gefütterten Tracer eintritt. Da aber innenmarkiertes Malat zur Zeit im Handel nicht erhältlich ist, applizierten wir an dessen Stelle Fumarsäure-2,3-¹⁴C, in der Annahme, daß dann der gewünschte Präkursor wegen der hohen Fumarase-Aktivität von Trauben (KOLAR 1970) durch den Organismus selbst synthetisiert werde. Wie aus Abb. 1 und Tabelle 1 hervorgeht, trifft dies erwartungsgemäß zu, war doch 6 Stunden nach Injektion von Fumarsäure-2,3-¹⁴C ein großer Teil (ca. 55%) des in der Säurefraktion auftretenden ¹⁴C in der Äpfel-

Tabelle 1

Bestimmung des ¹⁴C-Markierungsmusters von Äpfelsäure, isoliert 6 Stunden nach Injektion von Fumarsäure-2,3-¹⁴C in Traubenbeeren
Dertermination of the distribution of ¹⁴C in malic acid, isolated 6 hours after injection of fumaric acid-2,3-¹⁴C into grape-berries

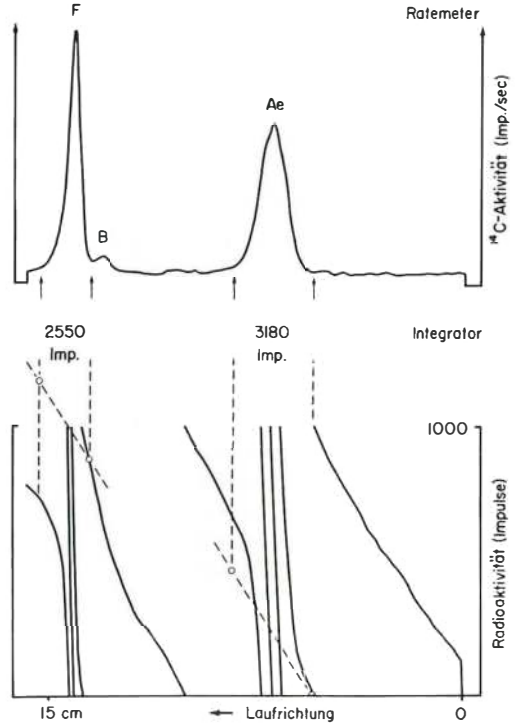
Proben- nummer	Radioaktivität an den Atomen			
	C2 + C3		C1 + C4	
	dpm	%	dpm	%
1	51 700	74	18 000	26
2	56 300	73	20 600	27
3	61 400	78	17 800	22

Abb. 1: Radiogramm der dünn-schicht-chromatographisch getrennten Säurefraktion, isoliert aus Trauben, 6 Stunden nach Injektion von Fumarsäure-2,3- ^{14}C .

F Fumarsäure B Bernsteinsäure
Ae Äpfelsäure

Radiogram of the acid fraction separated by thin-layer chromatography, isolated from grapes 6 hours after injection of fumaric acid-2,3- ^{14}C .

F fumaric acid B succinic acid
Ae malic acid



säure lokalisiert, bei deren Bildung aus dem Tracer nur geringe Randomisierung auftrat (deutliches Überwiegen der Radioaktivität an den inneren C-Atomen). Bei den angegebenen Zahlen handelt es sich um die Werte des Ansatzes vom 29. 8. 73; in folgenden Versuchen ergaben sich ähnliche Verhältnisse. Damit dürfte die methodische Voraussetzung zur Synthese von vorwiegend an den C-Atomen 1/2 und 5/6 markierter Glucose gegeben sein, falls tatsächlich der gluconeogenetische Weg Malat \longrightarrow Oxalacetat \longrightarrow Phosphoenolpyruvat \longrightarrow „inverse Glykolyse“ beschriftet wird.

Um nun die Existenz und gegebenenfalls auch Bedeutung der Gluconeogenese in Trauben zu untersuchen, wurde der Einbau von Radioaktivität aus ^{14}C -Äpfelsäure (in situ nach Injektion von ^{14}C -Fumarsäure gebildet: s. oben) in die Neutralfraktion reifender Beeren bestimmt. Die beobachteten relativen Inkorporationsraten (^{14}C -Aktivität der Neutralfraktion dividiert durch ^{14}C -Aktivität des äthanolischen Extraktes $\times 100\%$) sind in Abb. 2 in ein Diagramm eingetragen. Daraus ist ersichtlich, daß die Transformation von Malat in Zucker während der Reife einen quantitativ bedeutenden Vorgang darstellt, unmittelbar nach Beginn des Säureabbaus am intensivsten ist und mit zunehmendem Alter der Trauben stark abnimmt. Wie aus Abb. 3 hervorgeht, sind erwartungsgemäß alle 3 Hauptkomponenten der Neutralfraktion markiert, wobei auf Glucose und Fructose je rund 40% und auf die Saccharose etwa 20% der Aktivität entfallen. Diese Werte wurden durch radiogaschromatographische Analyse der Zucker (für die Methodik vgl. RUFFNER 1973) bestätigt.

Ist die in reifenden Trauben ablaufende Gluconeogenese aus Fumarat (und hieraus gebildetem Malat) dem Mechanismus nach prinzipiell gleich derjenigen aus Fettsäuren (s. Einleitung), so muß die in den obigen Versuchen synthetisierte ^{14}C -Glucose die Radioaktivität vorwiegend an den C-Atomen 1/2 und 6/5 tragen. Denn wenn durch PEP-Carboxykinase (EC 4.1.1.32) aus Oxalacetat das C4 seines Präkursors Äpfelsäure abgespalten wird — die Schlüsselreaktion der Gluconeogenese —, so resultiert aus Fumarsäure-2,3- ^{14}C Phosphoenolpyruvat-2,3- ^{14}C und nach Kondensation zweier daraus entstehender Triosen schließlich eine vorwiegend an den

Tabelle 2

Verteilung der Radioaktivität im Glucosemolekül, 6 Stunden nach Applikation von Fumarsäure-2,3-¹⁴C an Traubenbeeren
 Distribution of radioactivity in the glucose molecule, 6 hours after application of fumaric acid-2,3-¹⁴C to grape-berries

Probennummer	Radioaktivität an den Atomen			
	C1 + C2 dpm	C5 + C6 %	C3 + C4 dpm	C3 + C4 %
1	1060	80	256	20
2	1050	80,5	265	19,5
3	1240	81	290	19

C-Atomen 1,2,5 und 6 markierte Hexose. Tabelle 2 zeigt, daß die beiden außenstehenden Kohlenstoffatompaaire der Glucose in der Tat wesentlich stärker radioaktiv sind als das innere Paar (der Anteil der C-Atome 1 und 2 sowie 5 und 6 an der Gesamtaktivität des Moleküls beträgt durchschnittlich je 20%, derjenige von C3 und C4 10% pro C). Damit ist erwiesen, daß die Traube aus akkumuliertem Malat über den Weg der „inversen Glykolyse“ Hexosen zu bilden vermag.

2. Physiologische Bedeutung der Gluconeogenese

Zwischen der Umgebungstemperatur und der Äpfelsäurekonzentration von Traubenbeeren besteht eine inverse Relation (KLEWER 1968), weshalb der Einfluß der Temperatur auf die Gluconeogeneserate untersucht wurde. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, tritt entgegen der Erwartung innerhalb des untersuchten Bereiches keine kontinuierliche Intensivierung des interessierenden Prozesses, sondern eine Temperaturabhängigkeit entsprechend einer Optimumskurve, mit dem Maximum bei ca. 20 °C, auf. Da nun in der Praxis bei höheren Temperaturen aber immer auch höhere Zuckerkonzentrationen gemessen worden sind, galt es, dieses Resultat mit den Kurven für die Zucker- und Säurekonzentrationen von unter sich gleichwertigen, jedoch in verschiedenen Wärmemilieus wachsenden Früchten in Beziehung zu setzen. Dazu wurden jeweils Trauben vom gleichen Stock, die während der Reife der Sonne ausgesetzt bzw. ohne direkte Sonnenbestrahlung waren, in bezug auf Zucker- und Säuregehalte analysiert. Wie Abb. 4a zeigt, ist die absolute Zuckerkonzentration auch in den hier untersuchten Trauben bei Sonnenexposition höher; der Kurvenverlauf läßt aber erkennen, daß die Zuckersyntheserate während der beobachteten Zeitspanne bei den Schattentrauben größer ist. Analog dazu erweist sich auch die Intensität des Säuremetabolismus in diesen als höher (vgl.

Tabelle 3

Einbau von Radioaktivität aus Fumarsäure-2,3-¹⁴C in die Neutralfraktion von reifenden Trauben bei verschiedenen Temperaturen
 Incorporation of radioactivity from fumaric acid-2,3-¹⁴C into the neutral fraction of ripening grapes at different temperatures

	Einbau von ¹⁴ C (in % des Totalextraktes)		
	10°	bei 20°	30°
1. Versuch (12. 9. 73)	9,8	17,5	6,8
2. Versuch (19. 9. 73)	9,7	16,2	9,3

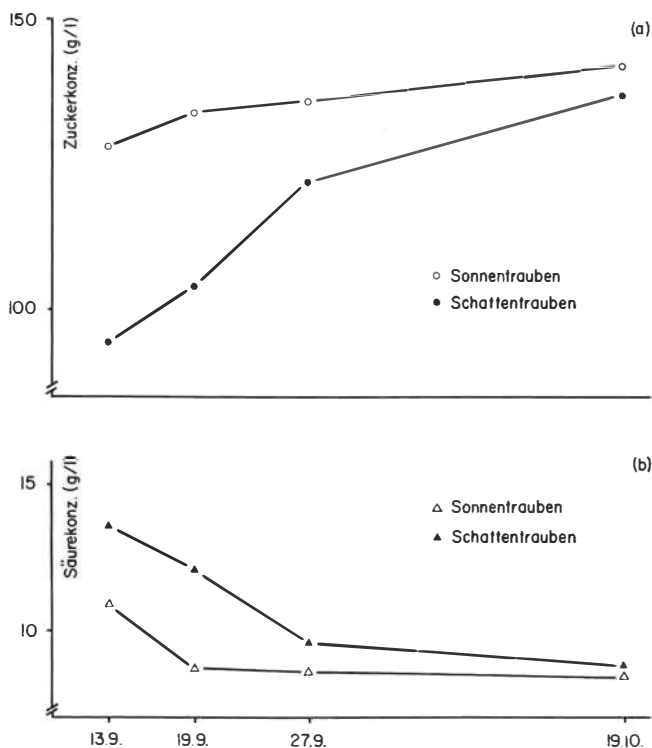


Abb. 4: Verlauf der Zuckerbildung (a) und des Säureabbaus (b) während der Reifeperiode 1973 von Trauben (Riesling \times Silvaner, Wädenswil) mit unterschiedlicher Sonnenexposition.

Time course of sugar accumulation (a) and of the degradation of acids (b) during the ripening period of 1973 in grapes („Riesling“ \times „Silvaner“, Wädenswil) grown under different exposure to the sun.

Abb. 4b), wobei beim Absinken des Säurepegels unter einen bestimmten Grenzwert die Bedingungen für einen weiteren Ab- oder Umbau offenbar in beiden Fällen nicht mehr gegeben sind.

Diskussion

Wie bereits oben dargelegt, vermindert die Applikation von innenmarkierter ^{14}C -Äpfel- bzw. -Fumarsäure anstelle von Malat- $4\text{-}^{14}\text{C}$ (wie von RIBÉREAU-GAYON und RIBÉREAU-GAYON (1969) verwendet) die Wahrscheinlichkeit, daß die beobachtete Transformationsrate von Äpfelsäure zur Hexose via „inverse Glykolyse“ infolge gleichzeitig ablaufender Decarboxylierung des Substrates oder von entsprechenden Metaboliten und photosynthetischer Refixierung des entstehenden radioaktiven CO_2 verfälscht wird. Die Verfütterung dieser Tracer im Dunkeln (HARDY 1968) würde zwar den Einfluß der Photosynthese ebenfalls ausschalten. Da aber in der Rebe auch lichtunabhängige Carboxylierungen ablaufen (MEYNHARDT 1965, HAWKER 1969, LAKSO 1973), kann durch diesen Kunstgriff eine Überlagerung des untersuchten Stoffwechselweges durch Refixierung von markiertem Kohlendioxyd nicht verhindert werden, dies um so mehr, als der Krebscyclus im Dunkeln (im Unterschied zu den Verhältnissen im Licht) nicht gehemmt ist (Lit. zit. in DRAWERT und STEFFAN 1966) und da-

mit auch bei Angebot von Fumarsäure-2,3- ^{14}C innerhalb der eingeräumten Stoffwechselperiode eine zu starke Randomisierung des Markierungsmusters zu erwarten wäre. Die hier angewendete Methodik, nämlich Verfütterung eines nicht-carboxylmarkierten Vorläufers der Äpfelsäure (Fumarsäure-2,3- ^{14}C) im Licht mit Bestimmung der Radioaktivität und des Markierungsmusters der interessierenden Folge- (Abb. 1 und Tabelle 1) und Zielsubstanzen (Tabelle 2 und Abb. 3), ermöglicht eine gegen die oben erwähnten störenden Einflüsse weitgehend abgesicherte Beurteilung des untersuchten Stoffwechselweges. So zeigt das in der Äpfelsäure gefundene ^{14}C -Verteilungsmuster (Tabelle 1: 75% Innenmarkierung), daß die Fumarsäure — u. a. im Krebszyclus — metabolisiert wird, ohne daß jedoch wesentliche Randomisierung der interessierenden Metabolite eintritt. Aufgrund der gefundenen ^{14}C -Verteilung im Äpfelsäurepool muß die Glucose im Falle einer Bildung über Phosphoenolpyruvat zumindest ein Schwergewicht der Markierung an den Positionen 1,2 und 6,5 zeigen (für Details s. oben). Die vorliegenden Analysen beweisen, daß dies zutrifft (Tabelle 2) und daß neben Glucose erwartungsgemäß auch Fructose und Saccharose markiert sind (Abb. 3). Damit wird die von DRAWERT und STEFFAN (1966), STEFFAN (1968) sowie RIBÉREAU-GAYON und RIBÉREAU-GAYON (1969) aufgestellte Hypothese der Existenz einer Gluconeogenese in Trauben via „inverse Glykolyse“ experimentell untermauert.

Aus der Parallelität der Kurven für die Einbauraten von ^{14}C -Malat in die Neutralfraktion und den Säuregehalt von reifenden Trauben sowie aus dem Markierungsmuster der hierbei synthetisierten Glucose geht eindeutig hervor, daß Äpfelsäure in diesen nach dem Zeitpunkt der „Veraison“ einen Vorläufer der Zucker darstellt, wobei diese Transformation auf dem Wege über Phosphoenolpyruvat geschieht. Die Zunahme des Zuckergehaltes ist — wie aus Abb. 2 hervorgeht — aber wesentlich größer (pro Woche ca. 15 g/l Preßsaft) als der gleichzeitig erfolgende Säureabbau (pro Woche etwa 5 g/l), so daß dieser schon rein rechnerisch nicht allein für die beobachtete Zunahme an Zucker verantwortlich sein kann, dies um so mehr, als die Äpfelsäure in Traubenbeeren auch anderweitig metabolisiert wird (vgl. MEYNHARDT 1965, DRAWERT und STEFFAN 1966, STEFFAN 1968, KRIEDEMANN 1968, RAPP *et al.* 1971, LAKSO 1973).

Für das gluconeogenetische System reifender Trauben ergibt sich *in vivo* ein Temperaturoptimum von etwa 20 °C (Tab. 3). Demnach ist die von KLIEWER (1968, 1973) festgestellte negative Korrelation von Temperatur und Äpfelsäuregehalt nicht auf eine durch das wärmere Milieu verursachte Stimulation der Gluconeogenese zurückführbar. Die bei höherer Temperatur (30 °C) erzielte kleinere Inkorporationsrate von ^{14}C -Malat in Zucker beruht möglicherweise auf einer durch gesteigerte Veratmung oder sonstigen Abbau bedingten lokalen Verarmung an für die Gluconeogenese verfügbarer Äpfelsäure. Diese Annahme wird durch Resultate von LAKSO (1973) unterstützt, der zwei mit dem Äpfelsäurestoffwechsel eng verbundene Enzyme — PEP-Carboxylase und Malatenzym — in bezug auf ihre Temperaturabhängigkeit untersucht und festgestellt hat, daß beim Zusammenspiel dieser beiden antagonistisch wirkenden Enzyme in der Traube die Bildung von Äpfelsäure bei Temperaturen von 20—25 °C favorisiert ist, und daß dann zudem der *s t o f f w e c h s e l - a k t i v e* Malatanteil wesentlich höher ist als bei 10 resp. 30 °C. Diese Fakten können das hier beobachtete Gluconeogeneseoptimum von etwa 20 °C erklären, da in diesem Wärmebereich offenbar sowohl die Anlieferung des Zuckerpräkursors als auch sein Vorliegen in metabolisch angreifbarer Form garantiert sind.

Vergleiche der Säure- und Zuckerkonzentrationskurven von Trauben, die am gleichen Stock unter verschiedenen Temperaturbedingungen zur Reife kamen (Abb.

4) zeigen, daß die von KLEWER (1968) gefundene Beziehung zwischen tieferer Temperatur und höherem Säuregehalt auch in dem von uns untersuchten Material realisiert ist. Die Unterschiede im Zuckergehalt zwischen den Trauben der beiden Standorte sind zu Beginn der Reife (Veraison) ebenfalls sehr ausgeprägt; mit fortschreitender Entwicklung ist aber eine deutliche Tendenz zum Ausgleich feststellbar (Abb. 4a), so daß am Schluß nur noch unbedeutende Unterschiede bestehen (vgl. hierzu auch KLEWER 1973). Die „Schattentrauben“ weisen demnach in der untersuchten Periode eine bedeutend höhere Zuckersyntheserate auf als die „Sonnentrauben“. Offenbar wirkt sich hier das relativ niedrige Temperaturoptimum der Gluconeogenese in einer Intensivierung der Zuckerbildung unter an sich ungünstigen Bedingungen aus. Auf diese Weise kann, unterstützt durch die oben erwähnte Anlieferung von Substrat (Malat), eine Nivellierung der Zuckerkonzentrationen von Früchten von Standorten unterschiedlichen Wärmeangebots erfolgen. Aufgrund der vorliegenden Untersuchungsreihe ist es zwar nicht möglich, den Anteil der Gluconeogenese an der Gesamtzunahme des Zuckergehaltes der Beeren genau zu erfassen; in Anbetracht der in relativ kurzer Stoffwechselzeit erreichten Inkorporationsrate von ca. 15% des Präkursors in die Neutralfraktion reifender Trauben dürfte diesem Weg unter optimalen Bedingungen jedoch eine nicht zu unterschätzende Bedeutung zukommen.

Zusammenfassung

Im Verlaufe der Reifeperiode 1973 wurde Traubenbeeren in wöchentlichen Intervallen Fumarsäure-2,3-¹⁴C injiziert und nach einer Stoffwechselzeit von 6 Stunden der Einbau des Tracers in Malat sowie die Neutralfraktion untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, daß — mit geringer Randomisierung des C-Skelettes des Präkursors — vorwiegend Äpfelsäure entsteht. Daneben erscheinen aber bis zu 17% der Radioaktivität in den Zuckern (Glucose, Fructose und Saccharose). Aufgrund der ¹⁴C-Verteilung im Glucosemolekül, welche ein Schwergewicht der Markierung in den C-Atomen 1, 2, 5 und 6 aufweist, kann auf die Existenz des „klassischen“ Gluconeogeneseweges (mit Oxalacetat, Phosphoenolpyruvat und Phosphoglycerat als Intermediärprodukten) in Traubenbeeren geschlossen werden. Die Inkorporationsrate des biogenetisch aus ¹⁴C-Fumarat entstandenen ¹⁴C-Malats in die Neutralfraktion ist bei ca. 20 °C am höchsten. Dieses relativ tiefe Maximum dürfte auf die in diesem Temperaturbereich optimale Versorgung der Früchte mit stoffwechselaktiver Äpfelsäure als Edukt für die Zuckersynthese zu erklären sein.

Vergleiche der Zuckergehalte von Trauben mit bzw. ohne direkte Sonnenbestrahlung lassen während des Reifeverlaufes bei den Früchten an beschatteten und damit kühleren Standorten eine deutlich intensivere Zuckerbildung erkennen, so daß dadurch der zum Zeitpunkt der „Veraison“ bestehende Unterschied im Zuckergehalt nahezu verschwindet. Es wird die Bedeutung der Gluconeogenese für diesen Ausgleich diskutiert.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die gewährte finanzielle Unterstützung sowie auch Herrn P. PERRET, Weinbau-techniker, für seine kompetente technische Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

Literaturverzeichnis

- ARONOFF, S., 1956: Techniques of radiochemistry. Ames: Iowa State College Press.
 BENEDICT, C. R. and BEEVERS, H., 1961: Formation of sucrose from malate in germinating castor beans. I. Conversion of malate to phosphoenol-pyruvate. *Plant Physiol.* 36, 540—544.
 BUSCH, H., HURLBERT, R. B., and POTTER, V. R., 1952: Anion exchange chromatography of acids of the citric acid cycle. *J. Biol. Chem.* 196, 717—727.
 CANVIN, D. T. and BEEVERS, H., 1961: Sucrose synthesis from acetate in the germinating castor bean: kinetics and pathway. *J. Biol. Chem.* 236, 988—995.

- COLAGRANDE, O., 1959: Formazione ed evoluzione degli acidi organici durante la maturazione dell'uva. *Ann. Mikrobiol. Enzimol.* 9, 62—67.
- DRAWERT, F., 1971: Métabolisme des sucres et des acides organiques. Premier symposium sur la physiologie de la vigne. Varna (Bulgarie).
- — und STEFFAN, H., 1966: Biochemisch-physiologische Untersuchungen an Traubenbeeren. III. Stoffwechsel von zugeführten ¹⁴C-Verbindungen und die Bedeutung des Zucker-Säure-Metabolismus für die Reifung von Traubenbeeren. *Vitis* 5, 377—384.
- GEISLER, G. und RADLER, F., 1963: Entwicklungs- und Reifevorgänge an Trauben von *Vitis*. *Ber. Dt. Bot. Ges.* 76, 112—119.
- HALE, C. R., 1968: Growth and senescence of the grape berry. *Austral. J. Agricult. Res.* 19, 939—945.
- HARDY, P. J., 1968: Metabolism of sugars and organic acids in immature grape berries. *Plant Physiol.* 43, 224—228.
- HAWKER, J. S., 1969: Changes in the activities of malic enzyme, malate dehydrogenase, phosphopyruvate carboxylase and pyruvate decarboxylase during the development of a non-climacteric fruit (the grape). *Phytochemistry* 8, 19—23.
- HULME, A. C., 1970: The biochemistry of fruits and their products. Vol. I. Acad. Press, London.
- KLIEWER, W. M., 1966: Sugars and organic acids of *Vitis vinifera*. *Plant Physiol.* 41, 923—931.
- — , 1968: Effect of temperature on the composition of grapes grown under field and controlled conditions. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 93, 797—806.
- — , 1973: Berry composition of *Vitis vinifera* cultivars as influenced by photo- and nycto-temperatures during maturation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 98, 153—159.
- — and SCHULTZ, H. B., 1964: Organic acids and sugar production in *Vinifera* grapevines. *Wines & Vines* 45, 26.
- KOLAR, G. F., 1970: Accumulation of fumarate in immature berries of *Vitis vinifera* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 62, 124—128.
- KRIEDEMANN, P. E., 1968: Observations on gas exchange in the developing Sultana berry. *Austral. J. Biol. Sci.* 21, 907—916.
- LAKSO, A. N., 1973: The influence of temperature on malic acid metabolism in grape berries. Ph. D. Thesis, Univ. Calif., Davis.
- MEYNHARDT, J. T., 1965: Biosynthesis of dicarboxylic acids through carbon dioxide fixation by an enzyme extract from Barlinka grape berries. *S. Afr. J. Agricult. Sci.* 8, 381—392.
- OAKS, A., 1962: Metabolism of pyruvate by starved cells of *Chlorella elipsoidea*. *Plant Physiol.* 37, 310—316.
- — and BEEVERS, H., 1964: The glyoxylate cycle in maize scutellum. *Plant Physiol.* 39, 431—434.
- RAPP, A., STEFFAN, H., KUPFER, G. und ULLEMAYER, H., 1971: Über den Säurestoffwechsel in Weinbeeren. *Angew. Chem.* 83, 925.
- RIBÉREAU-GAYON, P. et RIBÉREAU-GAYON, G., 1969: Etudes biochimiques sur la composition du raisin et ses variations. *Rev. Franç. Oenol.* 35, 3me Trimestre, 5—16.
- RUFFNER, H. P., 1973: Biogenese und Translokation von Tartrat in der Weinrebe. Diss. Univ. Zürich.
- STEFFAN, H., 1968: Untersuchungen über Veränderungen von Inhaltsstoffen in reifenden Beeren der Rebe mit ¹⁴C-Verbindungen. Diss. Karlsruhe.
- TANNER, H. und SANDOZ, M., 1972: Dünnschichtchromatographischer Nachweis bzw. halbquantitative Bestimmung der Wein-, Citronen-, Apfel-, Milch- und (Bernstein-)säure in süßen und vergorenen Getränken. *Schweiz. Z. Obst- Weinbau* 8, 182—186.
- THOMAS, S. M. and AP REES, T., 1972: Gluconeogenesis during the germination of *Cucurbita pepo*. *Phytochemistry* 11, 2177—2185.
- TREVELYAN, W. E., PROCTER, D. P., and HARRISON, J. S., 1950: Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature* 166, 444—445.

Eingegangen am 22. 5. 1974

Dr. H. P. RUFFNER
Dept. of Viticulture and Enology
University of California
Davis, Cal. 95616
USA
Dr. habil. W. KOBLET
Eidg. Anstalt für
Obst-, Wein- und Gartenbau

CH-8820 Wädenswil (ZH)
Schweiz
Prof. Dr. D. RAST
Institut für allgemeine Botanik
Universität Zürich
Künstlergasse 16
CH-8006 Zürich
Schweiz