

2. Andersen, S. & Hermansen, J. E.: Effect of hormone derivatives on cultivated plants II. Spraying of cereals with 2,4-D and 4K-2M at different dates. — Kgl. Vet. & Landbohøjskoles Årsskr., København 1950: 141.
3. Andersen, S.: Methods for determining stages of development in barley and oats. — *Physiol. Plant.* 5: 199. 1952.
4. — Sensitivity to 2,4-D of barley and oats at different stages of development. — *Physiol. Plant.* 5: 321. 1952.
5. Derscheid, L. A.: Responses of progeny of barley sprayed with 2,4-D. — *Agron. Jour.* 43: 517. 1951.
6. Eames, A. J.: Comparative effects of spray treatments with growth regulating substances on the Nut grass and anatomical modifications following treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetate. — *Amer. J. Bot.* 36: 571. 1949.
7. — Persistence of 2,4-D in plant tissues. — *Science* 112: 601. 1950.
8. Friesen, G. & Olson, P. J.: The effect of 2,4-D on the developmental processes in barley and wheat. — *Can. Jour. Agric. Sci.* 33: 315. 1953.
9. Gifford, E. M.: Effect of 2,4-D upon the development of the cotton leaf. — *Hilgardia* 21: 605. 1953.
10. Hanf, M.: Symptome der Schädigungen durch 2,4-D Mittel. — *Mitt. Biol. Zentralanst. Land-Forstwirtschaft. Berlin* 70: 37. 1951.
11. Pedersen, A., Andersen, S. & Hermansen, J. E.: Hormonderivaternes virkning på kulturplanterne I. Sprøjning af byg og havre med 2,4-D og 4K-2M. (Engl. Summary). — *Kgl. Vet. & Landbohøjskoles Årsskr., København* 1948: 101.
12. Smith, L.: Cytologi and genetics in barley. — *Bot. Rev.* 17: 1. 1951.
13. Staniforth, D. W.: Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on meristematic tissues of corn. — *Plant Physiol.* 27: 803. 1952.
14. Swanson, C. P.: Histological responses of the Kidney bean to aqueous sprays of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. — *Bot. Gaz.* 107: 522. 1946.
15. Unrau, J. & Larter, E. N.: Cytogenetical responses of cereals to 2,4-D. I. A study of meiosis of plants treated at various stages of growth. — *Can. Jour. Bot.* 30: 22. 1952.

## Mesure de l'activité de la chlorophyllase par chromatographie sur papier

Par

C. SIRONVAL<sup>1</sup>

Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université, Copenhague  
(Reçu le 25 Mars 1954)

Il est bien connu depuis Willstätter et Stoll (1913) que la chlorophylle peut être hydrolysée en solution acétonique aqueuse par de la poudre sèche de feuilles préalablement débarassée de pigments. La réaction est enzymatique et l'enzyme a été appelée «chlorophyllase».

L'activité de la chlorophyllase a été mesurée dans un certain nombre de plantes par Mayer (1930). Mayer utilise généralement 500 mg de poudre de feuilles séchées à la température ordinaire. L'hydrolyse a lieu dans une solution acétonique aqueuse à 66 % et à une température de 25° C. Les substrats utilisés sont, soit des produits purs isolés, soit des mélanges de ces produits, soit l'extrait acétonique total de limbes. Les produits de l'hydrolyse sont séparés par la méthode de Willstätter et Stoll, la chlorophyllide étant extraite par une solution de 0,02 N de potasse caustique. Weast et Mackinney (1940) séparent la chlorophyllide en se basant sur son insolubilité dans l'éther de pétrole; ils utilisent comme source d'enzyme le tissu végétal frais ou congelé, et constatent que le séchage préalable des tissus réduit fortement l'activité fermentaire.

Nous avons cherché à appliquer la chromatographie sur papier à la mesure de l'hydrolyse enzymatique de la chlorophylle.

<sup>1</sup> Actuellement, Chef de Travaux à l'Institut Botanique de l'Université de Liège, Belgique.

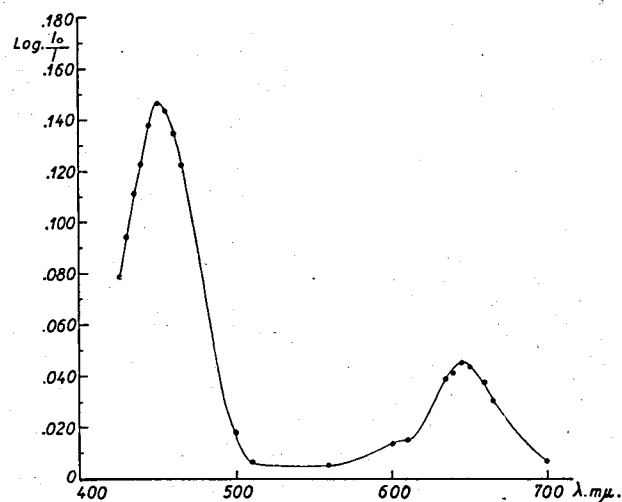


Figure 1. Spectre de la chlorophylle b dans l'éther sulfurique, après séparation sur papier. On a utilisé un spectrophotomètre Coleman.

### La chromatographie sur papier des pigments végétaux

Ainsi que nous l'avons montré antérieurement (Sironval, 1953 b), les deux chlorophylles a et b peuvent être chromatographiées sur papier en utilisant le procédé de Bauer (1952) quelque peu modifié; l'éluant est le mélange benzène: 10, éther de pétrole: 2,5, acétone: 2; le chromatogramme est descendant et l'opération a lieu dans une atmosphère d'éther de pétrole.

La séparation obtenue est bonne. La figure 1 représente le spectre dans

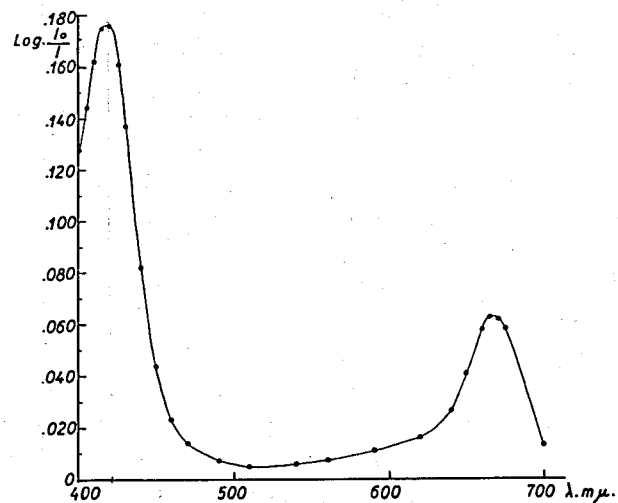


Figure 2. Spectre de la chlorophylle a dans l'éther sulfurique, après séparation sur papier. On a utilisé un spectrophotomètre Coleman.

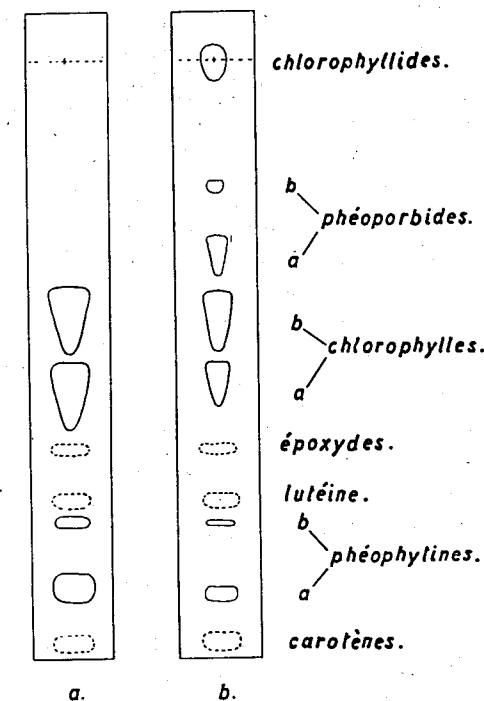


Figure 3. a) aspect du chromatogramme développé à partir d'un extrait acétonique de feuilles légèrement acide; b) aspect du chromatogramme après l'action de la chlorophyllase sur l'extrait.

l'éther sulfurique de la chlorophylle b ainsi préparée. Les maxima sont situés à 452 et 645 mμ, et le rapport entre le coefficient d'absorption dans le violet et le coefficient dans le rouge est de 2,97, valeur très proche des données de Zscheile et Comar (1941) et de Harris et Zscheile (1943) qui ont purifié spécialement le pigment. La figure 2 représente le spectre de la chlorophylle a dans l'éther sulfurique; les maxima sont ici assez fortement déplacés: à 420 et 665 mμ, tandis que les rapports entre les coefficients d'absorption violet/rouge est de 2,82 ce qui indique la présence constante d'une impureté absorbant dans le violet.

L'excellente séparation des pigments autorise les mesures quantitatives. La tache est délimitée (éventuellement sous U—V), découpée puis transférée dans une quantité connue d'éther. On laisse séjourner à la glacière pendant 24 h.; on mesure ensuite l'absorption à 665 mμ pour la chlorophylle a et à 645 mμ pour la chlorophylle b.

La chromatographie permet de séparer les phéophytines. Ces pigments obtenus par addition d'une goutte d'acide à quelques ml d'une solution de chlorophylles — et que l'on trouve aussi dans les extraits végétaux acides, par exemples, chez les jeunes feuilles de Pelargonium — se situent dans le chromatogramme presque en front de solvant. Lorsque la quantité en est

suffisante, la tache est visible à l'oeil. Sinon, il faut utiliser les U—V pour la révéler. L'extraction à l'éther est réalisée dans les mêmes conditions que l'extraction des chlorophylles et la solution montre la zone d'absorption caractéristique de l'absence de Mg, entre 500—540 m $\mu$ .

Quant aux produits dépourvus de phytol: chlorophyllides et phéophorbides, ils se déplacent peu sur le chromatogramme. Les chlorophyllides restent groupées autour de la tache de départ et se séparent à peine l'une de l'autre; tandis que les phéophorbides migrent légèrement, la phéophorbide a se situant au dessus de la chlorophylle b.

Un mélange complexe contenant les deux chlorophylles a et b, et les deux phéophytines, donne le chromatogramme représenté figure 3 a; après hydrolyse par la chlorophyllase, on obtient le chromatogramme 3 b, dans lequel on retrouve les constituants de départ à leur place normale, et, en outre, les taches des phéophorbides et du mélange de chlorophyllides. La concentration en phéophorbides ne permet généralement pas la localisation à l'oeil nu et il faut employer la lumière ultra-violette.

### Mesure de l'activité de la chlorophyllase

Tous les produits peuvent être élués à l'éther, sauf les chlorophyllides pour lesquelles on doit utiliser soit une solution de potasse caustique à 0,02 N, soit de l'éthanol à 60 %. L'éluion est quantitative.

Le tableau 1 donne un exemple des variations complexes observées au cours du temps dans un mélange contenant au départ de la phéophytine (a+b), de la chlorophyllide (a+b), de la chlorophylle a et de la chlorophylle b. Il s'agit d'une solution en milieu acide (pH 4,0) soumise à l'action d'une préparation enzymatique dont l'activité est faible. On voit diminuer à la fois la teneur en chlorophylle a, chlorophylle b et chlorophyllide totale, tandis que la teneur en phéophytine totale et en phéophorbide totale augmente. Il se produit deux processus: d'une part, la transformation de chlorophylle en phéophytine et de chlorophyllide en phéophorbide par élimination progressive du magnésium; et d'autre part, l'hydrolyse des chlorophylles et des phéophytines. Malgré la complexité des réactions, la quantité totale des pigments se retrouve heure après heure. L'estimation de l'hydrolyse prise seule peut se faire de deux manières: 1) en partant de l'augmentation de la teneur des phéophorbides dont on déduit la diminution de teneur des chlorophyllides; — 2) en partant de la diminution de teneur des chlorophylles a et b, dont on déduit l'augmentation de teneur des phéophytines. Dans les deux cas, la vitesse de l'hydrolyse est trouvée égale. La préparation d'enzyme étant peu active, cette vitesse varie peu d'heure en heure.

Tableau 1. Variations complexes dans un mélange de pigments soumis, en milieu acide (pH. 4,0), à l'action de la chlorophyllase (les quantités de pigments sont exprimées en  $\mu$ g).

Pigments	Quantité présente au départ	Quantité trouvée après:		
		1 h.	2 h.	3 h.
Chlorophylle a .....	6,0	4,5	3,1	1,7
Chlorophylle b .....	5,2	4,5	3,5	3,1
Phéophytine totale .....	9,0	9,8	10,5	11,2
Phéophorbide totale .....	0	1,5	3,7	5,3
Chlorophyllide totale .....	1,8	1,7	1,0	0,7
Total	22,0	22,0	21,8	22,0

Certains extraits acétoniques aqueux de tissus végétaux ont un pH voisin de 4. C'est le cas des extraits de feuilles jeunes de Pelargonium (pH: 4,2 à 5,0). Dans ces extraits, la vitesse de l'hydrolyse est généralement plus grande que celle de la phéophytinisation. Dans d'autres cas, le pH est relativement élevé, voisin de 6,0 ou de la neutralité, par exemple chez *Heracleum sphondylium*, et on n'observe pas la phéophytinisation. On peut évidemment tamponner les extraits et les amener au pH 6,0 qui, selon Mayer, est le plus favorable à l'action de l'enzyme.

La mesure exacte de l'activité de la chlorophyllase se fait de la manière suivante:

On part d'environ 100 mg de tissus frais; de préférence, on prélève à l'emporte-pièce une surface connue (par exemple, selon la méthode décrite par Sironval (1953 a). On broie immédiatement dans un petit mortier dans 1 ml d'acétone en présence de sable pur. On transfère dans un tube. On lave le mortier par 1 ml d'acétone; on transvase dans le tube en ayant soin de récolter convenablement tout le résidu sec subsistant après l'évacuation de l'acétone. On ajoute 1 ml d'eau bidistillée neutre (ou du tampon éventuel). On prélève du tube une quantité connue à l'aide d'une micropipette et on trans-

Tableau 2. Activité de la chlorophyllase contenue dans des quantités différentes de tissus frais, prélevées dans les mêmes feuilles. (u) = le pourcentage de pigments hydrolysés en 1 heure à 20° C, dans l'acétone à 66 %.

Objet expérimenté	No. du prélèvement	Quantité de tissu frais prélevé (mg)	(u) brut trouvé	(u) rapporté à 100 mg de poids frais
Jeunes feuilles de Pelargonium	1	267,4	59,4	22,2
	2	317,9	65,6	20,6
Feuilles adultes d' <i>Heracleum</i>	1	90,0	58,8	65,3
	2	167,8	110,1	65,9

Tableau 3. Variation de la vitesse d'hydrolyse dans des extraits de tissus frais. Le chiffre donné correspond à  $K \cdot 10^3 = \frac{10^3}{t} \log_{\text{nep}} \frac{a}{a-x}$ ; (a) étant la quantité de produits au départ et (x) la quantité de produits hydrolysés pendant le temps t exprimé en minutes.

Séries	Vitesse d'hydrolyse dans:		
	la première heure	les 2 premières heures	les 3 premières heures
1	25,3	16,2	11,5
2	23,2	14,4	9,4
3	19,3	12,5	8,9
4	19,2	11,9	8,7

ère sur une languette de papier de 5 cm de large sur 40 cm de long. On chromatographie: on obtient ainsi la teneur en pigment au départ. Le tube, soigneusement bouché, est agité pendant le temps voulu à 20° C. On fait alors un nouveau prélèvement qu'on chromatographie sur un papier identique à celui déjà décrit. Les papiers chromatographiés sont découpés puis élués, et l'absorption mesurée dans le rouge à la longueur d'onde correspondant à la substance étudiée. On calcule ensuite la quantité des divers produits hydrolysés. Le pourcentage hydrolysé par unité de temps est rapporté au poids frais, au poids sec ou à la surface. Dans le cas des jeunes feuilles, la surface est cependant indéterminable.

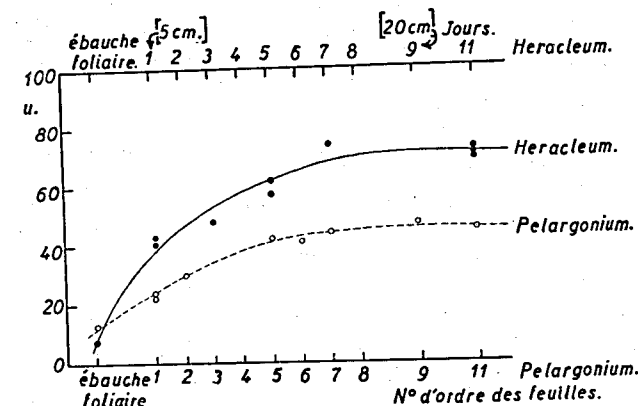
*Quelques résultats.* En utilisant cette méthode, deux prélèvements effectués en même temps sur les mêmes feuilles, donnent pendant le même temps la même hydrolyse. Nous donnons dans le tableau 2 des résultats obtenus de cette manière sur Pelargonium et sur Heracleum. Les quantités de tissus prélevés sont différentes, — comme les quantités de pigments présentes au départ —, mais la vitesse d'hydrolyse rapportée au poids frais est trouvée la même. Elle est exprimée dans le tableau 2 par le pourcentage (u) de pigments hydrolysés en 1h à 20° C dans l'acétone à 66 %.

Il importe d'effectuer les mesures en même temps, par exemple immédiate-

Tableau 4. Activité de la chlorophyllase à deux moments d'une même journée. Tous les dosages ont été faits sur les mêmes feuilles, qui le 23/2/54 étaient au début de leur croissance. (u) = le pourcentage de pigments hydrolysés en 1 h. à 20° C, dans l'acétone à 66 %.

Date des prélèvements	Pelargonium; (u) par 100 mg de poids frais, mesuré à:			Heracleum; (u) par 100 mg de poids frais, mesuré à:		
	11 h.	16 h.	différence	11 h.	16 h.	différence
23/2/54	22,2	20,6	- 1,6	40,4	40,5	+ 0,1
25/2/54	27,0	31,2	+ 4,2	47,3	49,8	+ 2,5
27/2/54	29,5	23,5	- 6,0	64,2	51,2	- 13,0
1/3/54	33,7	29,6	- 4,1	80,0	70,0	- 10,0

Figure 4. Variation de l'activité de la chlorophyllase en fonction de l'âge de la feuille. Pour Heracleum, la variation a été suivie jour après jour à partir d'une feuille de 5 cm. Pour Pelargonium la variation a été suivie de feuille à feuille. (u) est le pourcentage de pigments hydrolysés en 1 h. à 20° C, dans l'acétone à 66 %.



ment après l'écrasement des morceaux de limbes. Dans le cas de tissus frais, l'activité de l'enzyme varie en effet fortement au cours du temps ainsi que West et Mackinney l'ont observé. Le tableau 3 montre cette variation dans des extraits de Pelargonium, pendant les 3 premières heures suivant l'extraction. La méthode la plus pratique pour obtenir des résultats comparables consiste à mesurer l'hydrolyse pendant la première heure d'activité de l'enzyme.

Dans ces conditions, il est facile de retrouver par notre méthode une série de résultats anciens. On voit, par exemple, que l'activité des feuilles adultes dépend de l'espèce: Pelargonium hydrolyse beaucoup moins que Heracleum. L'activité est très faible dans les ébauches foliaires; elle augmente progressivement avec le vieillissement du limbe. Etant donné la quantité très faible de tissus nécessaires à une mesure, la méthode permet de mesurer la variation, non seulement en effectuant des prélèvements au même moment sur les diverses feuilles de plus en plus âgées d'une même plante, mais encore en suivant au jour le jour, sans la détruire, la même feuille au cours de son vieillissement (figure 4).

On peut même entreprendre la recherche d'éventuelles différences dans l'activité de la chlorophyllase, dans une même journée et dans une même feuille. Nos premiers résultats, rapportés Tableau 4, semblent indiquer des fluctuations.

## Résumé

L'auteur expose une méthode nouvelle de mesure de l'activité de la chlorophyllase. La méthode est basée sur la séparation des pigments et des produits de l'hydrolyse par chromatographie sur papier. Elle permet de travailler avec une quantité faible de tissus frais (environ 100 mg) et sa précision est

satisfaisante. En l'utilisant, l'auteur a retrouvé la plupart des résultats obtenus antérieurement, par des méthodes se rapprochant de celle de Willstätter et Stoll (1913).

Nous remercions vivement le Prof. Doct. D. Müller, de Copenhague, dans les laboratoires duquel ce travail a été effectué, pour l'aide précieuse et les conseils qu'il nous a prodigués. — Nous remercions également l'Institut de Recherches scientifique appliquées à l'Industrie et à l'Agriculture (I.R.S.I.A.) — Belgique, qui nous a soutenu par l'octroi d'une bourse.

#### Auteurs cités

- Bauer, L.: Die Trennung der Karotinoide und Chlorophylle mit Hilfe der Papierchromatographie. — *Naturwiss.*, 39: 88. 1952.
- Harris, D. & Zscheile, F.: Effects of solvent upon absorption spectra of chlorophylls a and b; their ultraviolet absorption spectra in ether solution. — *Bot. Gaz.*, 104: 515. 1943.
- Mayer, H.: Untersuchungen über die Chlorophyllase. — *Planta*, 11: 294. 1930.
- Sironval, C.: A propos du métabolisme de la chlorophylle dans la feuille (ses rapports avec la floraison). — *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, 85: 285. 1953 a.
- A propos de la chromatographie sur papier de la chlorophylle et des caroténoïdes des feuilles. — *Arch. Intern. Phys.*, 41: 563. 1953 b.
- Weast, C. A. & Mackinney, C.: Chlorophyllase. — *Journ. Biol. Chemistry*, 133: 551. 1940.
- Willstätter, R. & Stoll, A.: Untersuchungen über Chlorophyll. — Berlin, 1913.
- Zscheile, F. & Comar, C.: Influence of preparative procedure on the purity of chlorophyll components as shown by absorption spectra. *Bot. Gaz.*, 102: 463. 1941.

## Effect of Indole-Acetic Acid on Stomata and Photosynthesis

By

STEEN JOHANSEN

Laboratory of Plant Physiology, University of Copenhagen  
(Received April 10, 1954)

Indole-3-acetic acid, IAA, may influence photosynthesis of leaves either directly by acting upon the process proper, or indirectly by having an effect upon the opening or closing of the stomata.

*The effect of auxins on stomata.* The effect of various auxins on stomatal behaviour has been investigated in two ways. Some investigators applied the auxins directly to the leaves by spraying or by introducing the substance through the leaf stalk. In other cases the auxins were administered to the soil in which potted plants were grown. Among the first group of investigators Boysen Jensen (1935) used strong raw preparations of IAA produced by *Aspergillus niger*. He applied the preparations to the petioles of *Sinapis alba* and *Sambucus nigra* leaves and found no effect on the stomatal apertures. Bradbury and Ennis (1949, 1952) using 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D) found that both top and soil treatments of kidney bean plants were followed by partial stomatal closure. Player (1950) found no effect on the stomata of corn plants when the leaves were sprayed with various auxins, but in experiments with castor bean plants the transpiration was lowered by spraying with auxins in rather high concentrations, e.g., 1000 ppm IAA. Ferri and Lex (1948) found that soil treatment with beta-naphthoxyacetic acid of potted *Tropaeolum* was followed by stomatal closure. Ferri and Rachid (1949) treated the soil of different species of potted plants with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and beta-naphthoxyacetic acid. The plants reacted to the treatment by closing their stomata at least partially. According to Mitchell and Martin (1938), IAA applied to the first internode of etiolated plants retarded the transport of materials from the cotyledons and also the uptake of water