

surface determined with a planimeter and the measurements of width and length, and the product of both measurements, were studied in a set of leaves. The information obtained from the study of this set of leaves was similar to the one found by Schneiter (1978). This is, the best estimator is the product of length by width, but leaf width was a better estimator than leaf length, with an r^2 equal to 0.951.

Using a computer program, which selects the equation of first to fifth order that best fits the available data, it was found that a second order equation fitted the data well — its coefficients being statistically significant. A first ruler was constructed on the basis of the equation found, with the purpose of assessing its practicality.

For this, we made a comparison of the time invested in estimating foliar area with the ruler that had been constructed, or by measurements of leaf width and length and making the corresponding calculations. It was concluded that, by using the ruler, the invested time could be reduced 8 times (Pereyra, 1978).

The present study was carried out with the objective of adjusting the ruler mentioned in the previous communication, by studying the relation between width and leaf area in sets of small, medium-size and big leaves, independently as well as a single set because the equation on which the ruler was based ($y = -15.0 + 4.29x + 0.56x^2$), has a problem. By having an x coefficient different from 0 (-15.0), it is apparent that the estimation of small values will depart from the possible real values. In order to improve the estimations in this part of the scale, the equation obtained by means of the study carried out with the smallest leaves was used.

This equation had, also, an x coefficient different from though very close to, 0 therefore, the closest equation that passes through the origin was calculated. This equation was used to develop a nab for leaves with width ≤ 21 cm. The two equations used to construct a final scale were:

for x (width) values between 0 and 21 cm... $Y = 0.8x + 0.697x^2$

for x (width) values greater than 21 cm... $Y = -15 + 4.29x + 0.56x^2$

As a reference, a sequence of the calculated pairs of values

for a series in which the width increased 2 cm, are given below:

width cm	estim. area cm^2	width cm	estim. area cm^2
3	8.67	23	383.71
5	21.42	25	445.54
7	39.75	27	512.89
9	63.65	29	584.77
11	93.13	31	661.16
13	128.19	33	742.08
15	168.83	35	827.51
17	215.03	37	917.46
19	266.81	39	1011.94
21	324.17	41	1110.93

LITERATURE CITED

- CHAUD, P. and SHARMA, N.N. 1976. Constant for determining leaf area index in maize. *Indian Journal of Agronomy* 21:171 — 173.
- HATFIELD, J.L., STANLEY, C.D. and CARLSON, R.E. 1976. Evaluation of an electronic foliometer to measure leaf area in corn and soybean. *Agronomy Journal* 68:234 — 236.
- MCKEE, G.W. 1964. A coefficient for computing leaf area in hybrid corn. *Agronomy Journal* 56:240 — 241.
- PEREYRA, V.R. 1978. Metodo rapido para estimar area foliar en girasol (Helianthus annuus L.). Oleico (I.N.T.A. Manfredi) no 3:35.
- SCHNEITER, A.A. 1978. Non-destructive leaf area estimation in sunflower. *Agronomy Journal* 70:141 — 142.
- STICKLER, F.C., WEARDEN, S. and PAULI, A.W. 1961. Leaf area determination in grain sorghum. *Agronomy Journal* 53:187 — 188.
- TREHAN, K.B. et al. 1975. Measurement of leaf area in sunflower (Helianthus annuus L.). *Science & Culture* 41:238 — 239.
- WILLIAMS, R.F. 1953. Estimation of leaf area for agronomic and plant physiological studies. *Australian Journal Agricultural Research* 5:235 — 246.

T1982AGR09

PHOTOSYNTHESIS IN SUNFLOWER LEAVES: RUBP CARBOXYLASE PROPERTIES, ACTIVITIES AND QUANTITATIVE DETERMINATION.

PHOTOSYNTHESE CHEZ LE TOURNESOL: ACTIVITE, PROPRIETES, DOSAGE DE LA RUBP CARBOXYLASE.

B. RANTY¹, B. COURTIADE¹, M. PIQUEMAL¹, G. CAVALIÉ¹ and M. ROLLIER²

1 Centre de Physiologie Végétale, Université Paul Sabatier, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.
2 C.E.T.I.O.M., 174, avenue Victor-Hugo, 75116 Paris, France.

ABSTRACT

The photosynthetic assimilation rate of Sunflower, a C₃ species, is similar to C₄ plants (e.g. Maize). A more active or abundant RUBPC could explain this fact.

The highest carboxylase activity was found in young and just mature leaves, they were used for purification procedures and protein investigations. Sunflower purified RUBPC displayed a higher activity than that from other C₃ plants (e.g. Soybean, French Bean). K_m (RuBP an KHCO₃) of Sunflower enzyme was the same as Soybean's; but V_{max} of Sunflower protein is four times greater. For quantitative determination of RUPBC, antiserum was obtained from a rabbit after injection of the enzyme purified by ammonium sulfate fractionation, sucrose density gradient centrifugation and chromatofocusing. The carboxylation efficiency of Sunflower seems to be correlated with the quantity and the properties of RUBPC.

INTRODUCTION

Parmi les végétaux supérieurs, on distingue principalement les plantes de type C₃ dont le taux d'assimilation photosynthétique (12 à 28 mg CO₂.dm⁻².h⁻¹) est inférieur à celui des espèces de type C₄ (40 à 60 mg.CO₂.dm⁻².h⁻¹) (Zelitch, 1971). Une anatomie foliaire particulière et la présence d'une PEP carboxylase très active permettent aux végétaux C₄ une meilleure valorisation du CO₂ absorbé.

Le Tournesol, espèce C₃, présente la particularité d'avoir un taux de photosynthèse élevé (40 mg CO₂.dm⁻²h⁻¹), proche de celui des plantes C₄ (Lloyd et Canvin, 1977). Parmi les facteurs responsables de cette forte activité photosynthétique, on peut noter une faible résistance stomatique et un niveau élevé de saturation en lumière (Potter et Breen, 1980; Hesketh, 1963). Au niveau biochimique et enzymatique, il nous a paru intéressant d'étudier la RuBP carboxylase (E.C. 4.1.1.39) du Tournesol. En effet

chez plantes C₃, cette enzyme est responsable de la fixation primaire du CO₂ atmosphérique et apparaît directement impliquée dans la quantité de carbone incorporé par le végétal. L'existence de propriétés particulières de ce bioncatalyseur, chez le Tournesol, pourrait expliquer son rendement photosynthétique élevé. Il nous a paru cependant nécessaire, dans un premier temps, de préciser les modalités de la photosynthèse du Tournesol comparativement au Soja (C₃) et au Maïs (C₄).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Matériel végétal

Le Tournesol (*Helianthus annuus* L.) ainsi que les autres végétaux retenus pour cette étude (*Glycine max* L. et *Zea mays* L.) sont cultivés en salle conditionnée (héméropériode, 14 heures; hydrométrie, 80% de la saturation; température, 25°C le jour/18°C la nuit; intensité lumineuse, 50 W.m.⁻²) et alimentés avec une solution de Hoagland et Arnon.

*Méthodologie

— L'incorporation de ¹⁴CO₂ par des disques foliaires a été

retenue comme méthode d'estimation de l'activité photosynthétique des végétaux. Les métabolites radioactifs ont été extraits en milieu hydro alcoolique et analysés par électrophorèse et chromatographie; leur radioactivité a été déterminée, après autoradiographie, par scintillation en milieu liquide.

— Les protéines enzymatiques ont été obtenues par homogénéisation de 5 g de matériel végétal frais dans 20 ml de tampon Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 renfermant: Polyclar 2.5%, PEG 6000 0.5%, DTT 10 mM, EDTA 1 mM. Le surnageant obtenu, après filtration et centrifugation (20.000 g, 15 min) est retenu comme source d'enzyme. L'activité de la RuBPC a été mesurée par méthode radiochimique après activation de l'extrait enzymatique en présence de MgCl₂ et du bicarbonate (Wishnick et Lane, 1971). La réaction est initiée par l'addition du RuBP. La radioactivité acide-stable est mesurée, après réaction, par scintillation en milieu liquide.

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de Lowry *et al.* (1951)

Les dosage des chlorophylles a été réalisé selon la méthode d'Arnon (1949).

RÉSULTATS

Tableau I. Taux d'assimilation photosynthétique de CO₂ par des disques de feuilles de Soja (var. Amsoy), de Tournesol (var. Luciole) et de Maïs (var. Inra 240)

Végétaux	Activité photosynthétique		Teneurs en chlorophylles mg/g matériel frais
	mg CO ₂ dm ⁻² .h ⁻¹	μmoles CO ₂ mg ⁻¹ .chl.h ⁻¹	
Soja	3.27	17.7	5.43
Tournesol	8.73	62.1	3.78
Maïs	8.41	86.2	2.88

Dans nos conditions expérimentales, l'activité photosynthétique de Tournesol est équivalente à celle du Maïs et nettement supérieure à celle du Soja (Tableau I). La répartition du radiocarbone dans les produits de photosynthèse (Tableau II) conduit aux remarques suivantes:

— dans tous les cas, la fraction glucidique est la plus fortement marquée; ce résultat peut être attribué au temps

d'incorporation relativement long (10 min),

— chez le Maïs, l'importante radioactivité incorporée dans l'acide malique témoigne d'un mode d'assimilation C₄,

— chez le Soja et le Tournesol, les marquages de l'acide glycérique et des métabolites photorespiratoires (glycine et sérine) sont importants; ces résultats ont l'expression d'un métabolisme de type C₃.

Tableau II. Répartition de la radioactivité dans les produits de photosynthèse après 10 minutes d'incorporation en présence de 350 vpm en ¹⁴CO₂ à 25°C et d'une intensité lumineuse de 65 W.m⁻².

Métabolites	Soja	Tournesol	Maïs
Glycérate	9.5 %	6.4 %	3.4 %
Malate	3.6 %	6.6 %	13.2 %
Fumarate	—	0.1 %	2.4 %
Succinate	—	1.1 %	0.4 %
Alanine	4.2 %	9.8 %	15.1 %
Aspartate	5.5 %	8.8 %	2.3 %
Glutamate	3.7 %	6.4 %	2.1 %
Glycine + sérine	7.7 %	6.8 %	4.8 %
Glucides solubles	64.9 %	52.9 %	55.7 %
Composés phosphorylés	0.9 %	1.1 %	0.6 %

L'activité RuBP carboxylase a été déterminée sur des extraits protéiques de Tournesol et de Soja (Tableau III). On remarque que, quel que soit le

Tableau III. Activité RuBP carboxylase de Tournesol (var. Luciole) et du Soja (var. Amsoy)

Végétaux	Activité RuBPC n Kat./g matériel frais	Activité spécifique nKatal/mg protéines
Tournesol	200.6	9.12
Soja	58.7	4.85

mode d'expression des résultats, le niveau d'activité carboxylasique du Tournesol est nettement supérieur à celui du Soja. L'examen de la figure 1 révèle cependant que cette activité varie selon l'étage foliaire considéré: faible pour les feuilles âgées, elle atteint sa valeur maximale dans les feuilles jeunes et immatures. Tous les modes d'expression des résultats (en fonction de la teneur en chlorophylles, ou de la surface foliaire) conduisent à la même conclusion.

L'enzyme extraite des feuilles jeunes et purifiée par fractionnement au sulfate d'ammonium et passage sur tamis moléculaire, présente une activité spécifique de 40 nKatal/mg de protéines; ce résultat est toujours supérieur aux données relatives à l'enzyme pure d'autre plantes C₃ (Siegel et Lane, 1975; Harris et Stern, 1977). La détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme purifiée a montré que la RubPC du Tournesol ne présente pas une meilleure affinité envers ses substrats (RuBP et CO₂) que celle du Soja.

DISCUSSION — CONCLUSIONS

La comparaison des activités photosynthétiques des différents végétaux considérés montre que, quel que soit le niveau d'étude (feuilles entières, disques foliaires, cellules isolées), le Tournesol présente toujours un taux d'assimilation élevé, voisin de celui du Maïs. L'analyse des métabolites marqués élaborés lors de l'incorporation de ¹⁴CO₂ révèle toutefois que ce végétal assimile le carbone selon le mode C₃.

L'étude de la RuBP carboxylase a été entreprise afin de préciser, au niveau biochimique, les raisons de l'efficacité photosynthétique particulièrement élevée du Tournesol. Il a notamment pu être montré que:

- le biocatalyseur présente, chez ce végétal, un niveau d'activité supérieur à celui de l'enzyme des autres végétaux C₃;

- seules les feuilles jeunes ou immatures présentent cette particularité;

- le taux d'assimilation photosynthétique des feuilles plus âgées est, au contraire, sensiblement identique voire même inférieur à celui du Soja;

- l'affinité de la RuBP carboxylase du Tournesol pour ses substrats (RuBP, CO₂) n'est pas responsable du fort niveau d'activité observé.

Ces résultats suggèrent l'existence de propriétés particulières de la RuBP carboxylase chez le Tournesol et (ou) l'existence de teneurs plus élevées en ce biocatalyseur dans les feuilles jeunes et immatures. Le magnésium par exemple, cofacteur indispensable à la réaction de carboxylation (Jensen et Bahr, 1977) intervient aussi en tant qu'agent activateur de l'enzyme Lorimer *et al.*, 1976). Il pourrait ainsi participer, chez le Tournesol, à la mise en place d'un pool important de complexe enzymatique actif susceptible d'engendrer un fort niveau d'activité.

L'étude de l'évolution des teneurs en enzyme en fonction du développement foliaire a été jugé prioritaire. La méthode de

dosage du biocatalyseur qui nous a paru offrir les meilleures garanties de sensibilité et de spécificité (Mayer et Walker, 1978) est celle qui fait appel à l'immunocheimie. L'immunoserum a été obtenu après injection, à des lapins "New Zéland", d'une RuBP carboxylase de Tournesol purifiée par fractionnement au sulfate d'ammonium et centrifugation en gradient de densité Saccharose (Pineau *et al.*, 1979; Bjorkmann *et al.*, 1979). Les contrôles réalisés par électrophorèse sur plaque de polyacrylamide et par chromatofocalisation ont permis de vérifier le bon degré de pureté du biocatalyseur ainsi obtenu. Les dosages de la RuBP carboxylase sont en cours de réalisation.

BIBLIOGRAPHIE

- ARNON, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24, 1 — 15.
- BJORKMANN, O., BOYNTON, J. et BERRY, J. 1976. Comparison of the heat stability of photosynthesis, chloroplast membrane reactions, photosynthetic enzymes, and soluble proteins in leaves of heat adapted and cold adapted C₄ species. *Yb Carnegie Inst. Wash.* 76, 400 — 407.
- HARRIS, G.C. et STERN, A.I. 1977. Isolation and some properties of ribulose 1,5 biphosphate carboxylase oxygenase from *Red Kidney Bean* primary leaves. *Plant Physiology* 21, 141 — 162.
- HESKETH, J.P. 1963. Limitation to photosynthesis responsible for differences among species *Crop Science* 3, 493 — 496.
- JENSEN, R.G. et BAHR, J.T. 1977. Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase oxygenase. *Annual Review of Plant Physiology* 28, 379 — 400.
- LLOYD, N.D.H. et CANVIN, D.T. 1977. Photosynthesis and photorespiration in Sunflower selections. *Canadian Journal of Botany* 55, 30006 — 3012.
- LORIMER, G.H., BADGER, M.R. et ANDREWS, T.J. 1976. The activation of ribulose 1-5 biphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism and physiological implications. *Biochemistry* 15, 529 — 536.
- MAYER, R.J. et WALKER, J.H. 1978. Techniques in enzyme and protein immunochemistry. In *Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry*. Elsevier/North Holland Biomedical Press B119, 1 — 32.
- PINEAU, B., LE DOIGT, G., MAILLEFER, C. et LEFORT-TRANS, M. 1979. Présence de sous-unités de la RuBP Case dans les enveloppes des chloroplastes d'Epinard. *Plant Science Letters* 15, 331 — 343.
- POTTER, J.R. et BREEN, P.J. 1980. Maintenance of high photosynthetic rates during the accumulation of high leaf starch levels in Sunflower and Soybean. *Plant Physiology* 66, 528 — 531.
- SIEGEL, M.I. et LANE, M.D. 1975. Ribulose diphosphate carboxylase from Spinach leaves. In *Methods in Enzymology*. Colowick, S.P. et Kaplan, M.O. éd. Academic Press, New York London. 42, 472 — 480.
- WISHNICK, M. et LANE, D. 1971. Ribulose diphosphate carboxylase from Spinach leaves. In *Methods in Enzymology*. Colowick, S.T. et Kaplan, M.O. éd. Academic Press, New York London. 23, 570 — 577.
- ZELITCH, I. 1971. Environmental and physiological control of net photosynthesis in single leaves. In *Photosynthesis, Photorespiration and Plant Productivity*. Academic Press, London (England) 244 — 245.

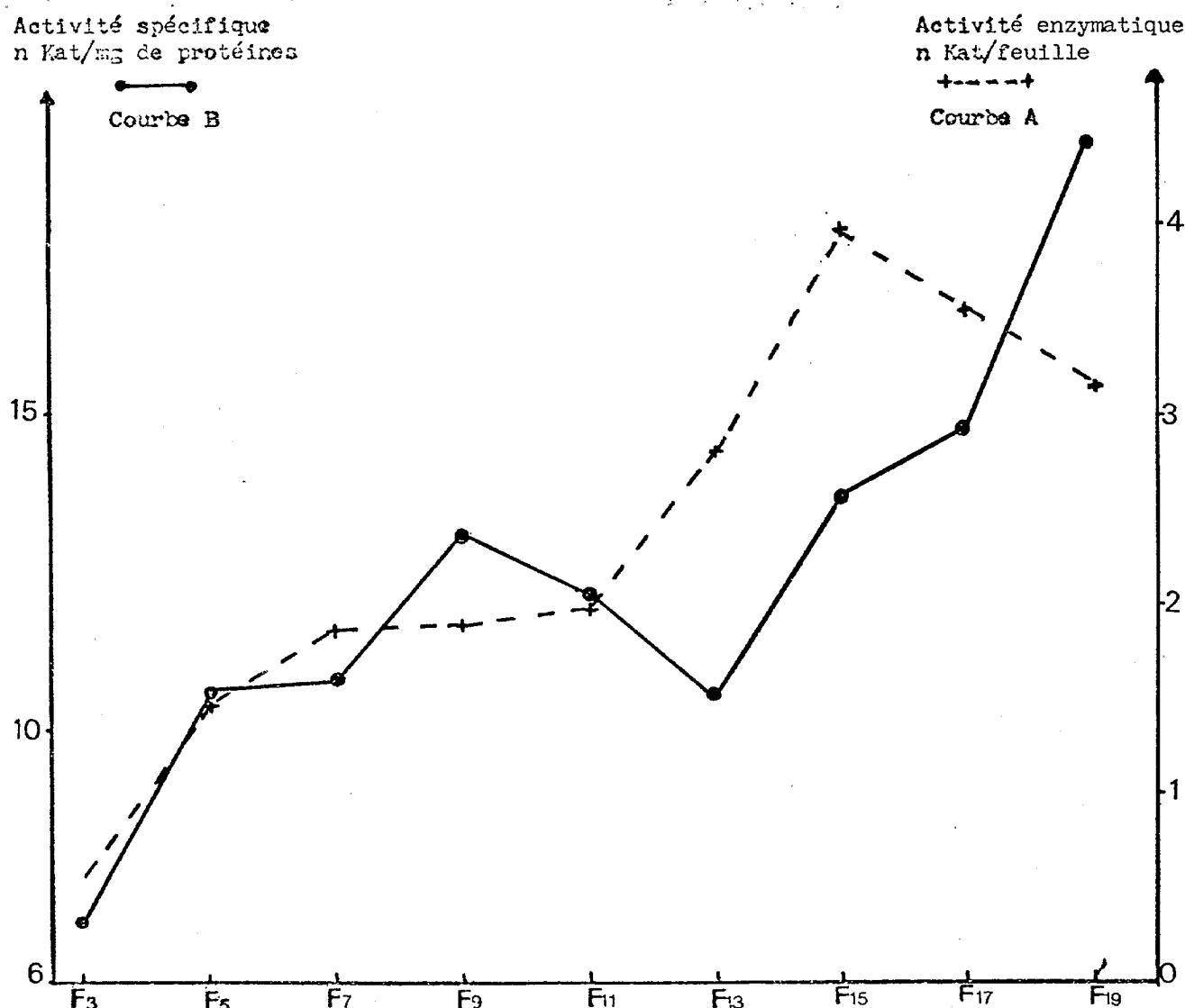


Figure 1. Evolution de l'activité RuBP carboxylase en fonction de l'étage foliaire.

T1982AGR10

EFFECTS OF DEFOLIATION DURING SEED FILLING OF SUNFLOWER.

F. CARDINALI, V.R. PEREYRA, C. FARIZO and G.A. ORIOLI
EERA Balcarce, INTA and Fac. Ciencias Agrarias, U.N.M.P., 7620, Balcarce, Argentina.

ABSTRACT

The effects of total defoliation of sunflower at different times during the seed filling phase were studied under field conditions at the EERA-INTA, Balcarce, Argentina, during the 1980 — 81 season. Plants were defoliated 7, 14, 21, 28 and 40 days after flowering (anthesis), and the dry matter of plant components was determined both at the time of defoliation and at physiological maturity.

The results indicate that defoliation early after flowering caused a marked decrease in harvest index, biological yield

and economic yield, and its components seed number and 1000 seed weight. The effects of defoliation became less severe as plants approached physiological maturity. On the basis of these, and other, results a model of the effect of defoliation at different growth stages is proposed.