

Untersuchungen über den Gaswechsel von *Bryophyllum* während der Lichtperiode

II. Beziehungen zwischen dem Malatgehalt des Blattgewebes und der CO₂-Aufnahme

MANFRED KLUGE

Botanisches Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

Eingegangen am 15. Januar 1968

Studies on Gas Exchange in Bryophyllum During the Light Period

II. Relations between Malic Acid Content in the Leaf Tissues and CO₂ Uptake

Summary. 1. All conditions which result in a low level of malic acid at the beginning of the light period (removal of CO₂ in the dark, considerably prolonged dark period, high temperatures in the dark) caused CO₂ uptake in the light period to start earlier than it did in the untreated control. The same result was obtained with treatment (increase of light intensity) which brings about faster degradation of the malate accumulated in the night. The course of CO₂ uptake seems therefore to be dependent on the extent to which the CO₂ pool (represented by malic acid) is filled.

2. The conversion of malate accumulated in the night into carbohydrates in light is characterized by a lag phase at the beginning of the light period. During this lag phase atmospheric CO₂ is consumed, but this consumption comes to an end when the first photosynthetic products of malate appear. There is evidence that external CO₂ is consumed by the leaf tissues only when carbon dioxide derived from an internal source (malate) is not available.

I. Einleitung

Der charakteristische Verlauf des CO₂-Austausches bei *Bryophyllum*, welcher sich als massive Aufnahme von atmosphärischem Kohlendioxid im Dunkel und in einer stark unterdrückten CO₂-Aufnahme im Licht äußert, ist auch an solchen Blättern zu beobachten, denen die Epidermis der Blattunterseite entfernt wurde (KLUGE u. FISCHER, 1967). Die wechselnde Intensität, mit der im Verlauf der Licht- und Dunkelperiode CO₂ der Außenluft verbraucht wird, ist daher keine Folge einer durch Spaltöffnungsbewegungen hervorgerufenen Änderung der Wegsamkeit der Epidermis für CO₂. NUERNBERGK (1961, 1962) forderte, um die oben beschriebenen Besonderheiten im Verlauf des Gaswechsels von *Bryophyllum* (und anderer Succulenten) erklären zu können, eine veränderliche Permeabilität des Plasmas für Kohlendioxid, die darüber entscheidet, ob CO₂ zu den Orten seines Verbrauchs in den Zellen gelangen kann oder nicht. Dieser Wechsel der Permeabilität des Plasmas

für CO_2 soll nach NUERNBERGK (1961, 1962) durch den Licht-Dunkel-Wechsel, vor allem aber durch die Temperatur, gesteuert werden.

Demgegenüber legen Befunde, nach denen im Dunkeln aufgenommenes CO_2 als Malat festgelegt und in der folgenden Lichtperiode aus der angehäuften Äpfelsäure wieder freigesetzt wird (vgl. die Übersichten bei RANSON u. THOMAS, 1960; BEEVERS, STILLER u. BUTT, 1966, sowie Teil I dieser Arbeit, KLUGE, 1968) nahe, zunächst in den mit dem CO_2 -Stoffwechsel so eng verknüpften Vorgängen des Säurestoffwechsels selbst nach dem Prinzip zu suchen, das für den Verlauf des CO_2 -Gaswechsels verantwortlich ist.

In der vorliegenden Arbeit wird deshalb der Versuch unternommen, unter diesem Blickwinkel Anhaltspunkte für das Verständnis des CO_2 -Gaswechsels der Succulenten zu gewinnen. Wir haben bei unseren Untersuchungen vorerst nur die Gestaltung des Kohlendioxidaustausches im Licht berücksichtigt. Hier gilt es vor allem zu verstehen, warum die nach Beginn der Beleuchtung zunächst gesteigert einsetzende CO_2 -Aufnahme schnell zum Kompensationspunkt absinkt (oder ihn gar nach zur Seite der CO_2 -Abgabe hin überschreitet), dort eine lange Zeitspanne verharret und erst in der letzten Phase der Lichtperiode wieder ansteigt (vgl. Abb. 1).

Die hier mitgeteilten Untersuchungen haben ihren Ausgangspunkt in folgender Arbeitshypothese:

Die nachts in den Assimilationsorganen der Succulenten angehäuften Äpfelsäure kann als Speicher für Kohlendioxid verstanden werden, welcher im Licht wieder CO_2 abgibt, das der Photosyntheseapparat wahrscheinlich leichter zu nutzen vermag als Kohlendioxid aus der die Blätter umgebenden Atmosphäre (RYTHER, 1956; KUNITAKE u. SALTMAN, 1958). Das dem endogenen Speicher entstammende CO_2 sättigt die Photosynthese ab, so daß solange kein Kohlendioxid der Außenluft verarbeitet wird, wie der Speicher noch nicht erschöpft, d. h. das nächtlich angehäuften Malat verbraucht ist. Wenn sich dieser Zustand schließlich einstellt, kann atmosphärisches CO_2 gebunden werden (letzte Phase der Lichtperiode, vgl. die Kurven in Abb. 1).

Nachdem wir bereits im Teil I unserer Untersuchung (KLUGE, 1968) zeigen konnten, daß aus dem nächtlich erworbenen Malat CO_2 freigesetzt wird und damit eine wichtige Voraussetzung unserer Arbeitshypothese erfüllt ist, haben wir im folgenden die Zusammenhänge zwischen dem Malatgehalt des Blattgewebes und dem Ausmaß und dem Verlauf der CO_2 -Aufnahme durch die Blätter zu prüfen. Trifft unsere Annahme zu, so sollten alle experimentellen Maßnahmen, die entweder die nächtliche Malatanhäufung unterbinden (Verhindern des Auffüllens des CO_2 -Speichers) oder den Verbrauch des Malat im Licht steigern

(beschleunigtes Entleeren des CO₂-Speichers) den Zeitpunkt des Wiederbeginns der Aufnahme von externem CO₂ vorverlegen.

Um das Bestehen derartiger Zusammenhänge zwischen Malatspiegel und dem Verlauf der CO₂-Aufnahme¹ im Licht nachzuprüfen, wurden von uns simultane Messungen des CO₂-Austausches und des Malatgehaltes intakter Individuen von *Bryophyllum tubiflorum* im Verlauf der Hell-Dunkel-Periode unter verschiedenen experimentellen Bedingungen vorgenommen. Im folgenden sei hierüber berichtet.

II. Material und Methoden

1. Die Versuchspflanzen

Für unsere Untersuchungen wurden Abkömmlinge eines Klons von *Bryophyllum tubiflorum* Harv. (*Kalanchoe tubiflora* Ham.) verwendet. Diese Art unterscheidet sich in ihrem physiologischem Verhalten nach all unseren bisherigen Erfahrungen von *Bryophyllum daigremontianum* nicht, bietet jedoch Vorteile bei der Entnahme von Proben für chemische Analysen. Die Versuchspflanzen entstammten einer Gewächshauskultur ohne besondere Licht- und Temperaturkontrolle. Sie wurden vor dem Experiment jedoch durch mehrtägigen Aufenthalt in den Cuvetten (s. dazu KLUGE u. FISCHER, 1967) an die Versuchsbedingungen adaptiert. In dieser Anpassungsphase wurde bereits der CO₂-Umsatz der Versuchspflanze mit dem URAS kontinuierlich kontrolliert. Zum Zeitpunkt der Experimente waren die Pflanzen 4—6 Monate alt.

2. Klimakammer, Beleuchtung, Anordnung zur Messung des CO₂-Austausches

Wir haben diese Einrichtungen bereits früher beschrieben (KLUGE u. FISCHER 1967). Die Wasserdampf-abgabe durch die Pflanzen wurde diesmal jedoch nicht registriert. Die „Normalbedingungen“ während unserer Experimente sind mit einer Lichtstärke von 7000 Lux in Höhe der Pflanze, 20°C und Hell-Dunkel-Wechsel von 12:12 Std definiert.

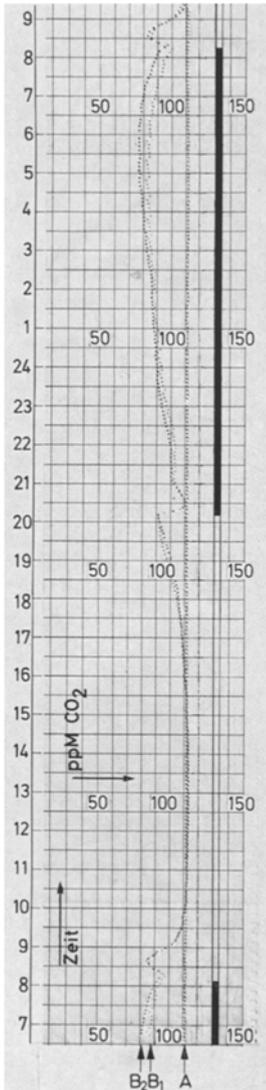
3. Bestimmung des L-(—) Malat

Die Analyse erfolgte enzymatisch in Anlehnung an HOHORST (1962). Um zahlenmäßig große Ansätze bewältigen zu können, wurde die Reaktion nicht in der Meßcuvette des Photometers, sondern bei allen Proben gleichzeitig in kleinen Reagensgläsern durchgeführt. Nach Zugabe des Enzyms (Malatdehydrogenase der Fa. Boehringer u. Söhne, Mannheim) wurde 1 Std bei 28°C auf dem Wasserbad inkubiert und nach Ablauf dieser Zeit bei einer Wellenlänge von 340 m μ gegen einen Blindwert (alle Reagentien außer Malat) photometriert. Die Malatgehalte der eingesetzten Proben (0,03 ml Extrakt, s. dazu weiter unten) wurden durch Vergleich mit einer Eichkurve (korrigiert auf L-(—) Malat, für jede Analyse neu angefertigt) erhalten. Bereitung der Extrakte: Von der Pflanze entnommene Phyllodien wurden sofort gewogen, in einen Potter-Elvehjem-Homogenisator mit 2 ml siedendem Wasser überführt, auf dem Wasserbad 5 min gekocht, homogenisiert und anschließend weitere 5 min gekocht. Schließlich wurde mit Wasser auf 5 ml aufgefüllt und 10 min bei ca. 3000 U/min abzentrifugiert. 0,03 ml des Überstandes wurden zum Malat-Test eingesetzt.

¹ Unter „CO₂-Aufnahme“ und „CO₂-Abgabe“ verstehen wir im folgenden die mit dem URAS meßbare Netto-Aufnahme bzw. -Abgabe.

4. Durchführung der Versuche

Jeweils zwei morphologisch möglichst gleichwertige Pflanzen wurden bei unseren Versuchen so eingesetzt, daß eines der beiden Exemplare als unbeeinflusste Kontrolle, das andere jedoch als eigentliches Versuchsobjekt diente. Es wurden immer nur solche Paare zusammengestellt, deren Glieder sich in ihrem Gasaustausch weitgehend gleich verhielten. Wieweit dies möglich ist, zeigt eine Originalregistrierung (Abb. 1). Im Experiment wurde der Gasaustausch der Versuchspflanze und der Kontrolle über mindestens eine Dunkel-Licht-Periode kontinuierlich



verfolgt, während gleichzeitig in bestimmten Zeitabständen (meist 2 Std) von beiden Pflanzen jeweils ein Phyllodium entnommen wurde. Das konnte geschehen, ohne daß die weiterlaufende CO₂-Registrierung wesentlich gestört wurde, wenn man die Cuvette nur kurzfristig einen Spalt weit öffnete und die Probe mit einer langen Pinzette vom Sproß abzupfte. Auf diese Weise wurden während eines Versuchs (10—12 Proben) ca. 10% aller an der Pflanze befindlichen Phyllodien entfernt. Die Phyllodien wurden aus der mittleren Region des Sprosses in zufälliger Reihenfolge entnommen. In dieser Zone waren die Phyllodien in Größe und Gestalt sehr ähnlich, streuten in ihren Frischgewichten nicht sehr stark und es zeigte sich vor allem, daß hier die Malatgehalte einer Normalverteilung folgen. Zur Kontrolle der Zuverlässigkeit der Malatbestimmung mit einem einzelnen Phyllodium wurden 10 Phyllodien zu gleicher Zeit entnommen (9.00 Uhr vormittags) und wie beschrieben aufgearbeitet. Es ergab sich ein Malatgehalt von

$$11,1 \text{ mg} \pm 0,78 \quad \left(s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \right)$$

In den meisten Fällen wurden Versuch und Kontrollversuch gleichzeitig durchgeführt. Versuche, bei denen Temperatureinflüsse verfolgt werden sollten, mußten notgedrungen nacheinander durchgeführt werden, derart, daß zunächst bei der Kontrollpflanze CO₂- und Malatgang unter „Normalbedingungen“ gemessen wurden und unmittelbar anschließend der eigentliche Versuch mit den veränderten Temperaturbedingungen stattfand.

Abb. 1. Originalregistrierung des CO₂-Umsatzes zweier Exemplare von *Bryophyllum tubiflorum* (B₁, B₂), die später in einem Experiment als Kontrolle und Versuchspflanze verwendet wurden. □ Lichtperiode, ■ Dunkelperiode. Registrierung rechts der Linie A (unbeeinflusste Außenluft) bedeutet CO₂-Abgabe (hier nicht vorkommend), links davon CO₂-Aufnahme

Wir haben in dieser Arbeit charakteristische Einzelexperimente stellvertretend für mehrere Wiederholungen (wenn nicht ausdrücklich anders vermerkt) dargestellt. Die Versuche wurden in der Zeit von Januar bis November 1967 durchgeführt.

Frau DORIS BENKERT danken wir für zuverlässige technische Hilfe, Herrn Prof. Dr. H. ZIEGLER und den Kollegen am Botanischen Institut für anregende Diskussionen.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat unsere Untersuchungen großzügig unterstützt.

III. Ergebnisse

1. CO₂-Aufnahme im Licht bei gesteigertem Malatverbrauch durch Zusatzbeleuchtung

Eine Möglichkeit, den Malatverbrauch in der Lichtperiode zu steigern und damit den CO₂-Speicher schneller zu leeren, ist die Erhöhung der Lichtintensität (vgl. u. a. WOLF, 1960). Unsere Versuchspflanze wurde bei diesem Experiment nach Ablauf der Dunkelperiode mit einer zusätzlichen Quecksilberdampflampe (Phillips 400 W) von der Seite derart angestrahlt, daß die Kontrollpflanze von diesem Licht nicht getroffen wurde. Die Versuchspflanze war somit gegenüber der Kontrolle einer zusätzlichen Lichtintensität von 10000 Lux ausgesetzt.

Die Blattertemperatur stieg dadurch auf 27°C an (Kontrollpflanze 22,2°C, Messung mit Kupfer-Konstantan-Thermoelementen). Zusätzliche Steigerung des Malatverbrauchs durch den Temperaturanstieg von ca. 5°C ist nicht auszuschließen, jedoch brachte eine derartige Temperaturerhöhung bei Normallicht keinen der unten beschriebenen Effekte. Außerdem ist es bei der Diskussion unserer Frage gleichgültig, ob ein gesteigerter Malatverbrauch nur durch Licht oder durch Licht plus Temperaturerhöhung verursacht wurde.

Das Experiment lehrt (Abb. 2), daß eine erhöhte Lichtgabe den Malatspiegel im Vergleich zur Kontrolle tatsächlich wesentlich schneller absinken läßt und daß damit ein früherer Wiederbeginn der CO₂-Aufnahme im Licht einhergeht. Die Kurven zeigen außerdem, daß die CO₂-Aufnahme dann einsetzt, wenn der zu Beginn der Dunkelperiode meßbare Malatspiegel wieder erreicht oder unterschritten, d. h., das nächtlich angehäufte Malat wieder verbraucht ist.

2. Die CO₂-Aufnahme im Licht nach Unterdrückung der Malatakkumulation in der vorangehenden Dunkelperiode

Folgende Maßnahmen führten zu niedrigem Malatspiegel bereits am Beginn der Lichtperiode: CO₂-Entzug im Dunkel, überhöhte Temperatur im Dunkel, überlange Dunkelperiode. Die Auswirkung dieser Bedingungen auf den Verlauf des CO₂-Austausches im Licht sei nun besprochen.

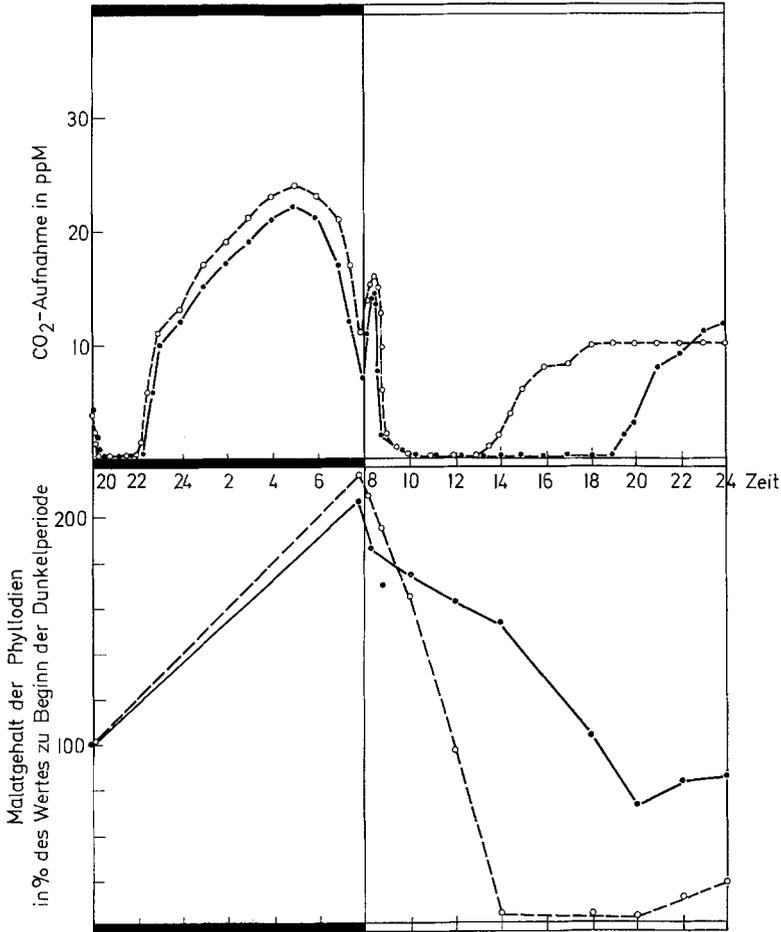


Abb. 2. Verlauf des CO₂-Umsatzes und des Malatgehaltes bei *Bryophyllum tubiflorum* bei Zusatzbeleuchtung (Einzelheiten im Text). ●—●—● Unbehandelte Kontrolle, ○—○—○ Versuchspflanze. Die CO₂-Kurven dieser und der anderen Abbildungen sind einfache Übertragungen der URAS-Registrierung

a) CO₂-Entzug in der vorangehenden Dunkelperiode. CO₂-Entzug wurde dadurch erreicht, daß der zur Versuchspflanze führende Luftstrom zunächst mehrere Waschflaschen mit 20% KOH passierte, ehe er in die Cuvette mit der Pflanze gelangte. Der CO₂-Entzug dauerte von 20.00—8.00 Uhr. Bei Belichtungsbeginn erhielt die Versuchspflanze wieder Normalluft.

Abb. 3 gibt das Ergebnis eines derartigen Experiments wieder. Bei CO₂-Entzug im Dunkel unterbleibt erwartungsgemäß die Malatanhäufung oder ist zumindest stark gehemmt (BONNER u. BONNER, 1948; THOMAS u. RANSON, 1954). Die von uns beobachteten Maximalwerte des

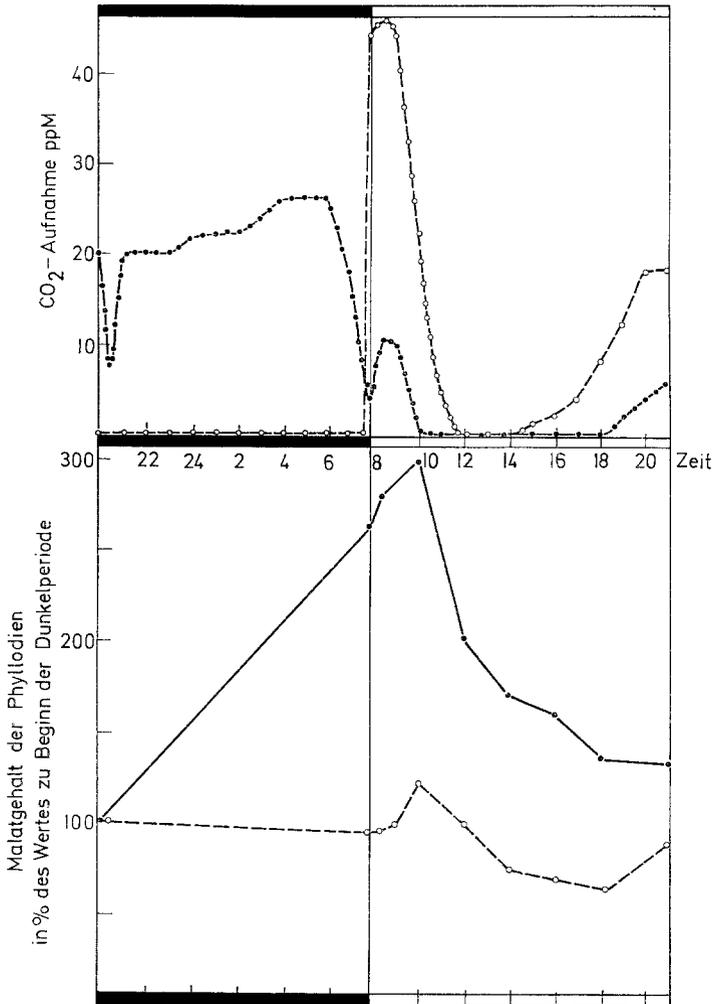


Abb. 3. Verlauf des CO₂-Umsatzes und des Malatgehaltes bei *B. tubiflorum* nach CO₂-Entzug während der Dunkelperiode. ●—●—● Unbehandelte Kontrolle, ○- -○-○ Versuchspflanze

Säuregewinns bei CO₂-Entzug liegen bei 20% des Wertes zu Beginn der Dunkelperiode gegenüber 150% bei der CO₂-Konzentration der Normalluft. Auch in diesem Falle nimmt die Pflanze mit dem niedrigeren Malatgehalt früher wieder CO₂ auf als die Kontrolle. Die Steigerung des Malatgehaltes in den ersten beiden Stunden nach Beginn der Belichtung wurde von uns in vielen Fällen beobachtet, jedoch trat sie nicht in allen Experimenten auf. Wir können das Phänomen vorläufig nicht erklären.

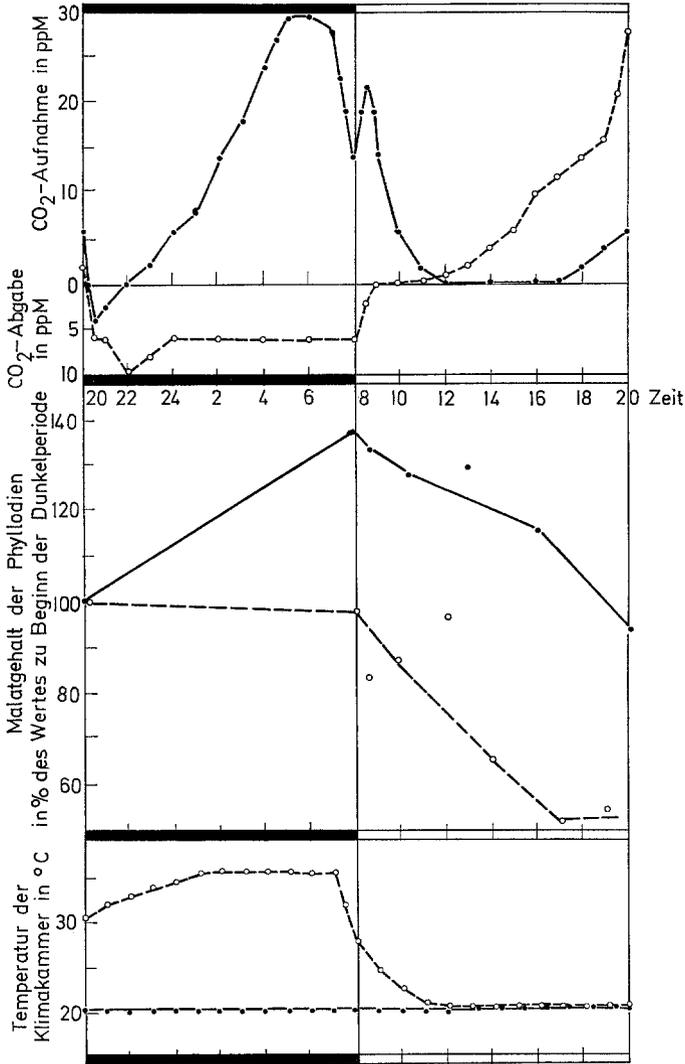


Abb. 4. Verlauf des CO₂-Umsatzes und des Malatgehaltes bei *B. tubiflorum* nach erhöhter Temperatur (36°C) in der Dunkelperiode. ●—●—● Unbehandelte Kontrolle, ○-○-○ Versuchspflanze

Auffällig ist die im Vergleich zur Kontrolle deutlich gesteigerte CO₂-Aufnahme sofort nach Beginn der Lichtperiode. Wir werden unsere Vermutungen hierüber später diskutieren.

b) *Hemmung der Malatspeicherung durch erhöhte Temperatur in der einer Lichtphase vorangehenden Dunkelperiode.* Die Angaben über die

Hemmung der Ansäuerung succulenter Pflanzen bei hoher Temperatur während der Dunkelperiode reichen teilweise zeitlich weit zurück (DE VRIES, 1884, weitere Angaben bei THOMAS u. RANSON, 1954). Unter unseren Bedingungen (maximale Temperatur während der Dunkelperiode

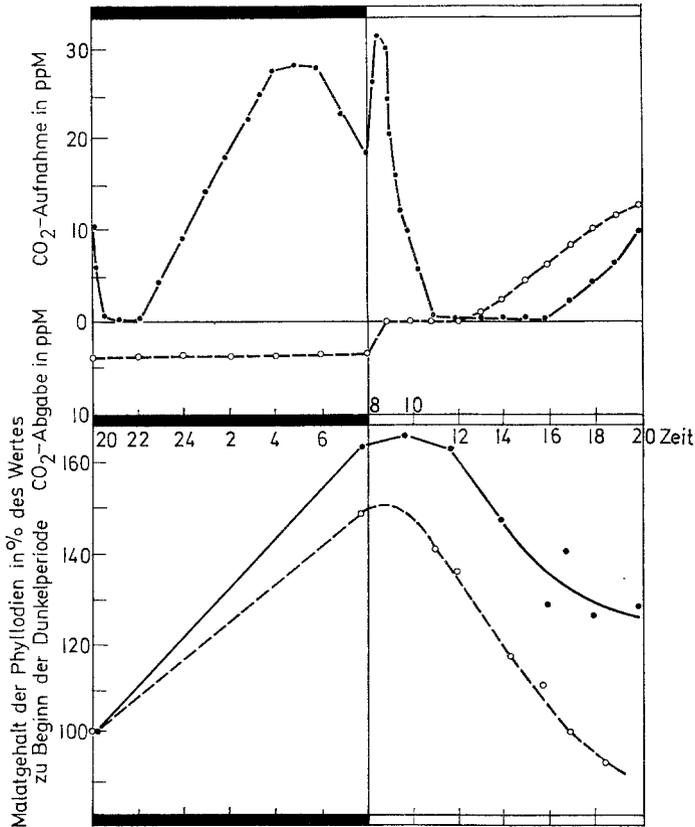


Abb. 5. CO₂-Umsatz und Malatgehalt bei *B. tubiflorum* nach überlanger Dunkelperiode (Einzelheiten im Text). ●—● Kontrolle unter Normalbedingungen, ---○--- Versuchspflanze. Es wurden bei ihr die letzten 12 Std der Dunkelperiode und die anschließende Lichtperiode dargestellt

36° C) ergab sich eine totale Hemmung der Malatanhäufung. Bei einer derartigen Temperaturerhöhung schlägt außerdem die normale nächtliche CO₂-Aufnahme in deutliche CO₂-Abgabe um (Abb. 4). Die in der Nacht hohen Temperaturen ausgesetzte Versuchspflanze wies also zu Beginn der Lichtperiode einen niedrigeren Malatgehalt auf als die Kontrolle, und wiederum war es diese Pflanze, die früher mit der CO₂-Aufnahme in der zweiten Hälfte der Lichtperiode begann (Abb. 4).

c) Herabsetzen des Malatspiegels zu Beginn der Lichtperiode durch überlange Dunkelperiode (vgl. WOLF, 1960). Bei diesen Experimenten wurde der Versuchspflanze und der Kontrollpflanze am gleichen Tag zum Ende der Lichtperiode eine Probe entnommen. Am folgenden Tag wurde der Malat- und CO_2 -Gang bei der Kontrollpflanze weiterverfolgt, während die Versuchspflanze in ihrer Cuvette unter fortlaufender Kontrolle des Gaswechsels unter einem Dunkelsturz gehalten wurde. Nach 84stündiger Verdunkelung wurde zu Beginn der normalen Lichtperiode (8.00 Uhr) der Dunkelsturz entfernt und der Malatgehalt neben dem CO_2 -Umsatz nun auch bei der Versuchspflanze gemessen.

Der Malatverlust im Dauerdunkel ist temperaturabhängig, und zwar fördern höhere Temperaturen diesen Vorgang (u. a. WOLF, 1960). Die Temperaturbedingungen in unserem Experiment (20°C) begünstigten einen nur langsamen Abbau des gespeicherten Malat. Demzufolge war am Ende der überlangen Dunkelphase noch ein beträchtlicher Teil der in den ersten 12 Std der Dunkelheit erworbenen Äpfelsäure vorhanden. Trotzdem ergab sich auch hier im Vergleich zur Kontrolle ein Unterschied im Malatgehalt zu Beginn der Lichtperiode. Erwartungsgemäß begann hier ebenfalls die Pflanze mit dem niedrigeren Gehalt an Äpfelsäure früher mit der CO_2 -Aufnahme im Licht (Abb. 5). Ein entsprechender Versuch wurde von uns in anderem Zusammenhang mit *Bryophyllum daigremontianum* angestellt, wobei die Temperaturen bei 26°C lagen. In diesem Fall begann die CO_2 -Aufnahme bereits unmittelbar nach dem Einschalten der Beleuchtung im Anschluß an die überlange Dunkelperiode. Leider wurde in diesem Fall der Verlauf der Absäuerung nicht verfolgt, doch läßt sich vermuten, daß der Malatgehalt zu Beginn der Beleuchtung sehr niedrig war, da Temperaturen um 25°C die Absäuerung im Dauerdunkel stark beschleunigen (vgl. u. a. WOLF, 1960).

3. Zum Problem der CO_2 -Aufnahme unmittelbar nach Beginn der Lichtperiode

Die bisher mitgeteilten Ergebnisse entsprechen der Voraussage, die wir, auf unserer Arbeitshypothese fußend, über den Zusammenhang zwischen CO_2 -Aufnahme im Licht und Malatgehalt der Blätter formulierten: Niedriger Malatspiegel ist verknüpft mit verkürzter Depression der CO_2 -Aufnahme im Licht. Damit ergeben sich zwar Ansatzpunkte für das Verständnis des CO_2 -Austausches im fortgeschrittenen Verlauf der Lichtperiode, unverständlich bleibt jedoch, daß sofort bei Beginn der Belichtung zunächst gesteigerte CO_2 -Aufnahme zu beobachten ist, die später zum Erliegen kommt.

Bestrebt, dieses Phänomen im Sinne unserer Arbeitshypothese zu deuten, nach der immer dann exogenes CO_2 gebunden wird, wenn endogenes Kohlendioxid nicht zur Verfügung steht, nehmen wir an, daß nach Beginn der Belichtung eine gewisse Zeit verstreicht, ehe aus Malat entstandenes CO_2 zu den Chloroplasten gelangt und die photo-

synthetischen Zentren besetzt. In dieser Zeit könnten die Chloroplasten CO₂ der Atmosphäre verbrauchen.

Das Studium der Kinetik, mit der aus ¹⁴CO₂ im Dunkel synthetisiertes Malat bei Belichtungsbeginn der Photosynthese zugeführt wird, sollte Aufschluß darüber geben, ob am Anfang der Lichtperiode bei der Überführung des Malat in die photosynthetisch gebildeten Folgeprodukte tatsächlich eine Verzögerungsphase auftritt. Eine solche ist zu

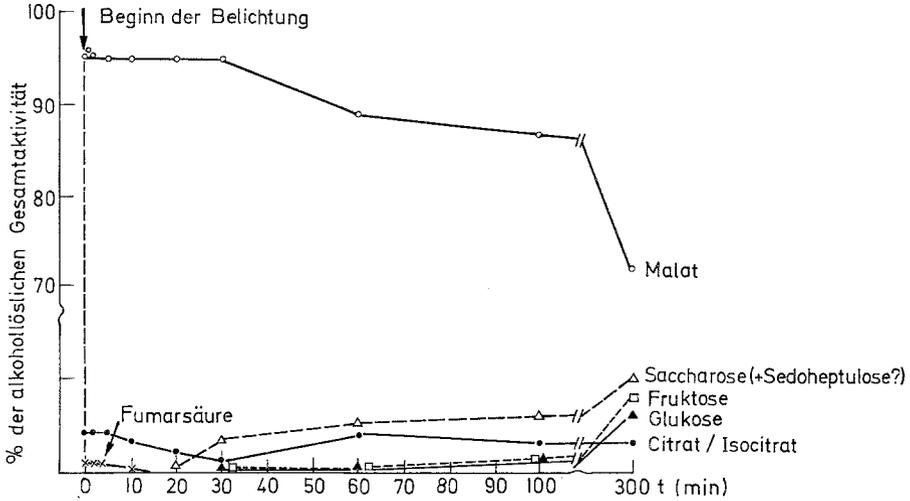


Abb. 6. Anteil der einzelnen ¹⁴C-markierten Verbindungen an der gesamten Radioaktivität der alkohollöslichen Fraktion im Verlauf der ersten 300 min der Lichtperiode

erwarten, wenn unsere Annahme richtig sein sollte. Wir stellten also folgendes Experiment an (Einzelversuch):

Zwei Phyllodien von *Bryophyllum tubiflorum* wurden in der Dunkelphase mit ¹⁴CO₂ markiert (vgl. KLUGE, 1968). Noch im Dunkel wurden von beiden Phyllodien von der Spitze ca. 0,5 cm lange Enden abgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Beginn der Belichtung wurden auf die gleiche Weise weitere Proben entnommen. Die Phyllodien standen während des Experiments mit der Basis in etwas Wasser. Der Versuch fand unter unseren „Normalbedingungen“ statt. Die gefrorenen Proben wurden gefriergetrocknet, mit Alkohol extrahiert und die Extrakte der dünnstschichtchromatographischen Analyse unterzogen (SIMONIS u. GIMMLER, 1964, vgl. KLUGE, 1968).

In Abb. 6 ist das Ergebnis dieses Experiments dargestellt. Die Überführung der Radioaktivität aus dem Malat in Kohlenhydrate durchläuft unmittelbar nach Beginn der Belichtung tatsächlich eine Verzögerungsphase. Sie beträgt ca. 30 min, und es ist dies gerade die Zeitspanne, in der auch die CO₂-Aufnahme am Beginn der Lichtperiode noch ansteigt. Nach dieser Zeit beginnt die CO₂-Aufnahme abzusinken (s. dazu alle unsere Abbildungen, vor allem die Originalregistrierung

Abb. 1). Diese Phase im Gaswechsel wiederum stimmt überein mit dem ersten Auftreten der photosynthetischen Folgeprodukte des Malat, welche anzeigen, daß in zunehmendem Maße endogenes CO_2 verarbeitet wird und mit dem exogenen Kohlendioxid um die Zentren der Photo-

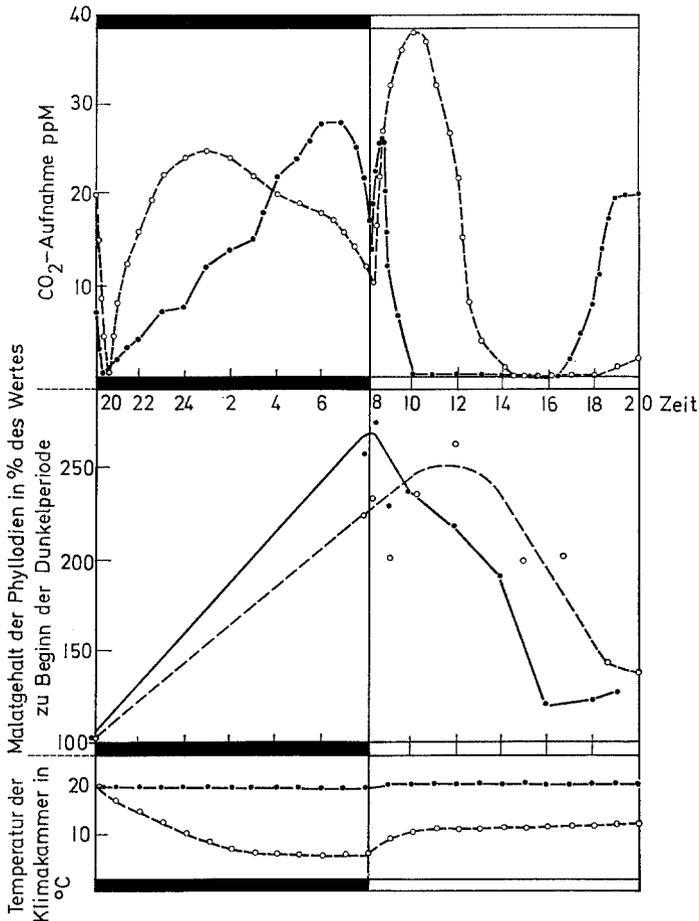


Abb. 7. CO_2 -Umsatz und Malatgehalt bei *B. tubiflorum* bei erniedrigter Temperatur (Sollwert 7°C). ●—●—● Kontrolle unter Normalbedingungen, ○- - -○ Versuchspflanze

synthese konkurriert. Wie die Verzögerungsphase zustande kommt, ist uns vorläufig noch unklar. Einige Vermutungen werden wir später noch diskutieren.

Eine weitere Stütze für die Vermutung, daß bei Belichtung solange exogenes CO_2 verarbeitet wird wie das Photosynthesesystem noch nicht

durch endogenes (aus dem gespeicherten Malat stammendes) CO₂ besetzt ist, liefert der Befund, daß die CO₂-Aufnahme nach Beginn der Belichtung bei tieferen Temperaturen wesentlich gesteigert ist und länger andauert, während sich gleichzeitig der Malatverbrauch verzögert (Abb. 7).

Dieser Temperaturversuch (Einzelexperiment) wurde ebenfalls so durchgeführt, daß zunächst bei der Kontrollpflanze unter Normalbedingungen Malat- und CO₂-Gang verfolgt und danach die Klimakammer auf 5°C eingestellt wurde. Dies geschah zu Beginn der Dunkelperiode, um sofort bei beginnender Belichtung im gewünschten Temperaturbereich zu sein. Die Kapazität unserer Kühlanlage reichte allerdings nicht aus, die Solltemperatur gegen die Heizwirkung der Beleuchtungseinrichtung zu halten. So stieg die Temperatur im Verlauf der Lichtperiode von 5°C auf 13°C (s. den eingezeichneten Temperaturgang in Abb. 7).

Die Deutung des Ergebnisses unseres Experiments im oben dargelegten Sinne erscheint um so mehr berechtigt, als BRANDON (1967) zeigen konnte, daß als Folge der Temperatureigenschaften der am Säurestoffwechsel der Succulenten beteiligten Enzyme der Malatumsatz bei Temperaturen unter 15°C auf der Seite der Anhäufung, oberhalb dieser Temperatur jedoch auf der Seite des Abbaus liegt. Tatsächlich haben wir uns im Verlauf unseres Experiments während der Lichtperiode der kritischen Temperatur sehr stark genähert, und so ergibt sich die Möglichkeit, daß der schließlich doch einsetzende Malatverbrauch und die damit verbundene Blockade des Photosynthesesystems für externes CO₂ durch die sich langsam steigernde Temperatur unserer Klimakammer ausgelöst wurde. NUERNBERGK (1962) berichtet, daß *Bryophyllum daigremontianum* bei einer Temperatur von 7°C im Licht ununterbrochen CO₂ aufnimmt. Leider wissen wir über den Verlauf des Malat-Verbrauchs in seinem Experiment nichts, doch darf nach den Ergebnissen BRANDONS (1967) angenommen werden, daß bei dieser gleichbleibend niedrigen Temperatur gespeichertes Malat überhaupt nicht mehr in CO₂ überführt wird und es deshalb nicht zu einer Blockade der Photosynthesezentren kommt, Kohlendioxid der Luft deshalb jederzeit photosynthetisch gebunden werden kann.

4. CO₂-Aufnahme und Malatgehalt unter natürlichem Licht-Dunkel-Wechsel

Alle bisher mitgeteilten Resultate wurden an Versuchspflanzen gewonnen, die einem künstlichen 12stündigen Hell-Dunkel-Wechsel ausgesetzt waren. Es drängt sich die Frage auf, ob auch unter natürlichen Lichtbedingungen ähnliche Beziehungen zwischen CO₂-Austausch und Malat Spiegel des Blattgewebes zu beobachten sind.

Ein Exemplar von *Bryophyllum tubiflorum* wurde im Freiland des Botanischen Gartens in eine Cuvette montiert und über eine ca. 20 m lange Schlauchleitung

mit dem URAS im Labor verbunden. Temperaturregelung war nicht möglich. Der Versuch wurde am 14./15. 6. 1967 durchgeführt. Die Lichtintensität wurde mit einem Luxmeter in regelmäßigen Abständen gemessen. Der Himmel war während des Versuchstages bedeckt, die Lufttemperatur schwankte während des Versuchs zwischen 10—15°C. Das Experiment (Einzerversuch) wurde von Herrn cand. rer. nat. P. POKINSKI durchgeführt.

Auch unter natürlichen Lichtverhältnissen konnten wir starke, jedoch geregelte Schwankungen der CO₂-Aufnahme feststellen (Abb. 8).

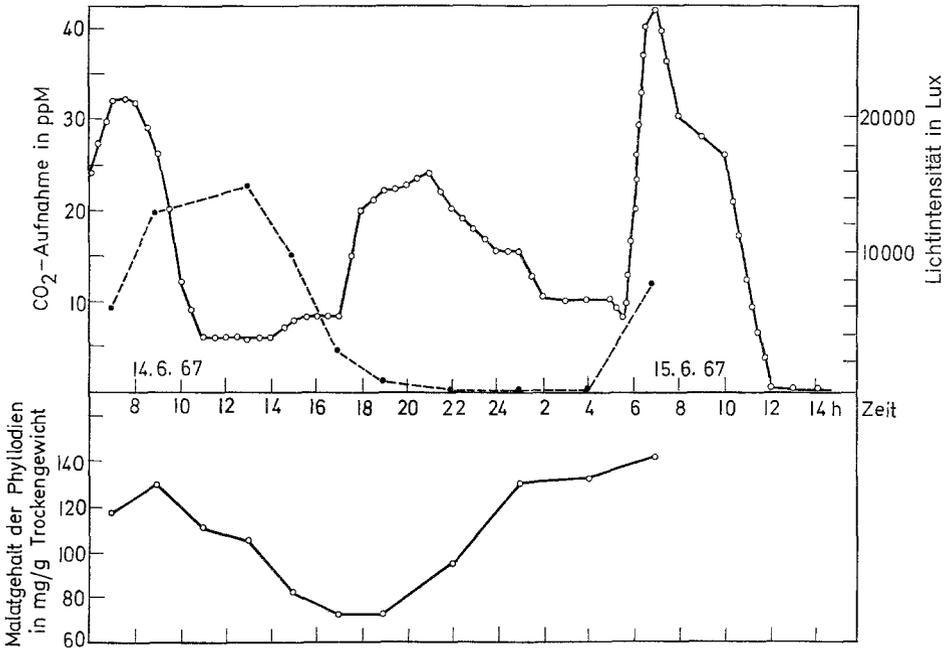


Abb. 8. CO₂-Umsatz und Malatgehalt bei *B. tubiflorum* unter natürlichen Lichtverhältnissen. ○—○—○ Versuchs-pflanze, ●-●-●-● Verlauf der Lichtintensität

Die Zeit von 10.00—18.00 Uhr zeichnet sich auch hier durch eine Depression im Verbrauch von atmosphärischem CO₂ aus, während in der Nacht massive Dunkelfixierung zu beobachten ist. Analog zum Klimakammerversuch wird am frühen Morgen verstärkt CO₂ aufgenommen, ehe die Depression einsetzt. Wie erwartet, beginnt die CO₂-Aufnahme am Nachmittag zu dem Zeitpunkt, an dem der Malatvorrat aufgebraucht ist (Abb. 8, 14. 6.; 17.00 Uhr). Dieser Zustand wird hier dadurch kenntlich, daß der Malatgehalt nicht weiter abfällt. Wir haben somit Grund, anzunehmen, daß die Mehrgipfligkeit im Verlauf der CO₂-Aufnahme auch unter natürlichen Lichtverhältnissen den Füllzustand des CO₂-Speichers widerspiegelt.

IV. Diskussion

Wir sehen uns durch die Ergebnisse der hier beschriebenen Experimente in unserer Vermutung bestärkt, daß für das Zustandekommen der für *Bryophyllum* charakteristischen Kurven des CO₂-Austauschs im Licht weniger eine sich ändernde Wegsamkeit des Plasmas für Kohlendioxid (NUERNBERGK, 1961, 1962) als vielmehr der Füllstand des CO₂-Speichers (Malat) von Bedeutung ist. In den früheren Arbeiten NUERNBERGKS (1955 a, b) klingen derartige Vorstellungen an, werden aber später (NUERNBERGK, 1961, 1962) unter dem Eindruck der Wirkung verschiedener Licht- und Temperaturbedingungen auf den Gaswechsel zugunsten der „Permeabilitätshypothese“ zurückgestellt. Die Messungen NUERNBERGKS haben den Nachteil, daß die Lage des Malat spiegels in den einzelnen Phasen des Gaswechsels nicht verfolgt wurde. Soweit wir vergleichbare Versuchsbedingungen gewählt haben, können wir die von NUERNBERGK mitgeteilten Befunde über den Gaswechsel bei *Bryophyllum daigremontianum* bestätigen. Dies gilt für die Angaben über den CO₂-Gaswechsel unter natürlichen Lichtbedingungen (NUERNBERGK, 1955 b), über die Wirkung erhöhter Temperatur in der Dunkelperiode (NUERNBERGK, 1962) und teilweise für Mitteilungen über den Effekt tiefer Temperaturen am Tage (unsere Versuchsbedingungen waren in diesem Punkte unzulänglich). Licht und Temperatur sind jedoch Faktoren, die den Stand des CO₂-Speichers in einer Weise regulieren, die für die Richtigkeit unserer Arbeitshypothese spricht und deren Einfluß auf den CO₂-Austausch deshalb nicht zwingend als Auslöser oder Regler von Permeabilitätsänderungen des Plasmas gedeutet werden braucht. Obwohl einige unserer Experimente befriedigend deutlich zeigen, daß die Aufnahme von externem CO₂ gerade zu dem Zeitpunkt wieder einsetzt, an dem das zu Beginn der vorangehenden Dunkelperiode feststellbare Malatniveau wieder erreicht, die nächtlich erworbene Malatmenge also verbraucht ist (vgl. z. B. Abb. 2), können wir die Gültigkeit dieser Feststellung jedoch nicht für alle unsere Versuche verallgemeinern. Unter gewissen Bedingungen hört der Malatverbrauch im Licht bereits auf (oder verlangsamt sich deutlich), wenn das Ausgangsniveau noch nicht wieder erreicht ist (Abb. 7). Immerhin glauben wir uns jedoch zu folgender allgemeinen Beschreibung der Beziehung zwischen dem CO₂-Austausch im Licht und dem Malatgehalt des Blattgewebes berechtigt: Je niedriger der Malatgehalt zu Beginn der Lichtperiode ist oder je schneller der Verbrauch des nachts akkumulierten Malats im Licht abläuft, umso früher setzt die Verarbeitung von CO₂ der Außenluft ein. Im wesentlichen scheint somit unsere Prognose, die wir, von unserer Arbeitshypothese ausgehend, über die Zusammenhänge zwischen CO₂-Aufnahme während der Lichtperiode und dem Malatgehalt in den Blattzellen gestellt haben, eingetroffen.

Recht beschränkt sind vorerst noch unsere Erklärungsmöglichkeiten für die sprunghafte CO_2 -Aufnahme zu Beginn der Lichtperiode. Zwar konnten wir zeigen, daß bei plötzlich einsetzender Belichtung erst nach einer Verzögerung von 30 min radioaktiver Kohlenstoff aus dem Malat in Kohlenhydrate überführt wird, so daß die Annahme nicht unbegründet erscheint, der Photosyntheseapparat werde erst nach dieser Verzögerungsphase durch internes CO_2 in zunehmendem Maße abgessätigt und sei deshalb zunächst aufnahmefähig für Kohlendioxid der Außenluft. Das eigentliche Problem ist jedoch die Erklärung, wie es zur Verzögerung der Malatumwandlung kommt. Wir bewegen uns hier vorläufig völlig im Bereich der Spekulation. Vielleicht müssen bei der Diskussion dieser Frage Transportprobleme in Rechnung gestellt werden, die dadurch gegeben sein könnten, daß die Lagerung, der Abbau und die Weiterverarbeitung des nachts gebildeten Malat auf verschiedene Kompartimente in der Zelle verteilt sind. In diese Richtung deuten auch die Vorstellungen BRADBEERS (1963), nach denen durch CO_2 -Dunkelfixierung gebildetes Malat schnell in einen „storage pool“ (wohl Vacuole) transportiert, aus diesem jedoch vergleichsweise langsam (besonders bei Temperaturen von 20°C und darunter) zum Abbau in einen „cycle pool“ (wohl Mitochondrien) überführt wird. Wir konnten zeigen, daß bei tieferer Temperatur die Verzögerungsphase im Malatverbrauch übereinstimmend mit den Vorstellungen BRADBEERS tatsächlich verlängert zu sein scheint, und es ist denkbar, daß bei gleichbleibend niedrigen Temperaturen während der Lichtperiode, wie sie NUERNBERGK (1962) anwenden konnte, überhaupt kein Malat aus dem „storage pool“ in den „cycle pool“ überführt wird, deshalb kein endogenes CO_2 entsteht und ununterbrochen externes Kohlendioxid verarbeitet wird, wie es NUERNBERGK (1962) ja beobachtete. Eine wesentlich einfachere und experimentell besser belegte Erklärungsmöglichkeit ergibt sich jedoch aus den bereits besprochenen Befunden BRANDONS (1967), nach denen die Temperatureigenschaften der Enzyme des Säurestoffwechsels dafür sorgen, daß bei Temperaturen unter 15°C Äpfelsäure kaum abgebaut, in Malat gespeichertes CO_2 also nicht frei werden kann.

Wir sind somit nicht darauf angewiesen, die für *Bryophyllum* unter normalen Bedingungen charakteristische Depression der CO_2 -Aufnahme im Licht als Verschlechterung der Durchlässigkeit des Cytoplasmas für Kohlendioxid zu deuten. Wir glauben vielmehr, aus unseren Befunden ableiten zu können, daß die Verarbeitung von externem CO_2 durch das Blattgewebe ein Zeichen dafür ist, daß internes, aus dem CO_2 -Speicher (Malat) stammendes Kohlendioxid zu dem betreffenden Zeitpunkt nicht zur Verfügung steht und das Photosynthesesystem blockiert, was immer auch die Ursache für die fehlende Bereitstellung sein mag. Kommt es zur Hemmung des Verbrauchs von CO_2 der Außenluft, so erblicken wir

darin ein Zeichen dafür, daß der Vorrat des CO₂-Speichers genutzt wird, endogenes Kohlendioxid den Assimilationsapparat sättigt.

Ein bemerkenswertes Ergebnis unserer Untersuchung ist schließlich, daß der Verlauf des Gaswechsels, sei es im Licht oder im Dunkel, bereits im voraus determiniert werden kann. Die einer Dunkelperiode vorausgehende Lichtphase entscheidet mit den gegebenen Lichtbedingungen darüber, ob und wieviel CO₂ in der Nacht als Malat gebunden wird (s. dazu die Literaturübersicht bei WOLF, 1960; vgl. NUERNBERGK, 1961; KLUGE u. FISCHER, 1967); die in der Dunkelperiode erworbene Malatmenge wiederum entscheidet über den Verlauf der CO₂-Aufnahme in der folgenden Lichtperiode. Dieses Ergebnis ist besonders auch für die Beurteilung der biologischen Bedeutung des diurnalen Säurerhythmus der Succulenten und des mit ihm verknüpften CO₂-Gaswechsels interessant. Die natürlichen Standorte z. B. von *Bryophyllum* (Trockenbusch Madagaskars [RAUH, 1967]) zeichnen sich durch tiefe Nachttemperaturen und hohe Tagestemperaturen aus. Dies sind gerade die Bedingungen, welche eine optimale Säureanhäufung ermöglichen (vgl. u. a. WOLF, 1960; RANSON u. THOMAS, 1960). Der hohe Malatgehalt am Ende der Nacht bedingt jedoch eine verhältnismäßig lang andauernde Absäuerungsphase während des Tages. Da der Abbau der Äpfelsäure mit der Freisetzung größerer Mengen CO₂ verknüpft ist, der CO₂-Partialdruck in den Intercellularen deshalb sicher ansteigt und als Folge dieses Vorgangs Spaltenschluß auftritt (KLUGE u. FISCHER, 1967), ist die Transpiration während der Phase des Säureverbrauchs gedrosselt. Je größer der nachts angelegte Malatvorrat ist, um so länger dauert dieser Zustand an, um so später im Verlauf des Tages beginnt die Pflanze mit der Aufnahme von externem CO₂ unter Öffnen der Stomata. Unter natürlichen Bedingungen dürfte dies zu einer Tageszeit geschehen, zu der die Phase maximaler Evaporation bereits verstrichen ist. Auch die vom Öffnen der Stomata begleitete CO₂-Aufnahme in der ersten Phase der Lichtperiode (vgl. dazu KLUGE u. FISCHER, 1967), welche ja auch unter natürlichen Lichtverhältnissen aufzutreten scheint (s. Abb. 8), fällt wahrscheinlich in eine Zeit geringerer Beanspruchung des Wasserhaushaltes.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß sich die nächtliche Akkumulation des Malat nicht nur als nützlich zur Garantie einer positiven Kohlenstoffbilanz erweist, sondern entscheidend beider Verminderung des Wasserverlustes am Tage mitwirkt.

Zusammenfassung

1. Alle Maßnahmen, die zu einem niedrigen Malatspiegel zu Beginn der Lichtperiode verhelfen (CO₂-Entzug im Dunkel, stark erhöhte Temperatur im Dunkel, überlange Dunkelperiode) haben zur Folge, daß

die CO₂-Aufnahme in der zweiten Hälfte der Lichtperiode früher einsetzt als bei der unbehandelten Kontrolle. Das gleiche gilt für Maßnahmen, die einen schnelleren Abbau des nachts akkumulierten Malat bewirken (Erhöhung der Lichtintensität). Der Verlauf der CO₂-Aufnahme scheint daher maßgeblich vom Füllstand des durch das Malat repräsentierten CO₂-Speichers bestimmt zu sein.

2. Die Umwandlung des Malat in Kohlenhydrate durchläuft bei plötzlich einsetzender Belichtung eine Verzögerungsphase. Da diese Phase von intensivem Verbrauch externen Kohlendioxids begleitet ist, der dann zum Erliegen kommt, wenn die ersten photosynthetischen Folgeprodukte des Malat auftreten, schließen wir, daß endogenes Kohlendioxid mit dem CO₂ der Luft um die Assimilationszentren konkurriert, so daß exogenes CO₂ nur dann verbraucht werden kann, wenn endogenes (aus dem Malat stammendes) noch nicht oder nicht mehr zur Verfügung steht.

Literatur

- BEEVERS, H., M. N. STILLER, and V. S. BUTT: Metabolism of the organic acids. In: F. C. STEWARD, Plant Physiology, vol. IV, B. New York and London: Academic Press 1966.
- BONNER, W., and J. BONNER: The role of carbon dioxide in acid formation by succulent plants. Amer. J. Bot. **35**, 113 (1948).
- BRADBEER, J. W.: Physiological studies on acid metabolism in green plants. IX. The distribution of C¹⁴ in malate of darkened *Kalanchoe* leaf fragments after infiltration with labelled pyruvate. Proc. roy. Soc. (Lond.) B **157**, 279—289 (1963).
- BRANDON, P. C.: Temperature features of enzyme affecting crassulacean acid metabolism. Plant Physiol. **42**, 977—984 (1967).
- HOHORST, H. J.: L-(—)-Malat. Bestimmung mit Malatdehydrogenase und DPN. In: H. BERGMAYER, Methoden der enzymatischen Analyse. Weinheim: Verlag Chemie 1962.
- KLUGE, M.: Untersuchungen über den Gaswechsel von *Bryophyllum* während der Lichtperiode. I. Zum Problem der CO₂-Abgabe. Planta (Berl.) (im Druck) (1968).
- , u. K. FISCHER: Über Zusammenhänge zwischen dem CO₂-Austausch und der Abgabe von Wasserdampf durch *Bryophyllum daigremontianum* Berg. Planta (Berl.) **77**, 212—223 (1967).
- KUNITAKE, G., and P. SALTMAN: Dark fixation of CO₂ by succulent leaves: conservation of the dark fixed CO₂ under diurnal conditions. Plant Physiol. **33**, 400—403 (1958).
- NUERNBERGK, E. L.: (a) Über den zeitlichen Verlauf der Photosynthese bei Gewächshauspflanzen. Gartenbauwiss. **19**, 391—398 (1955).
- (b) Zur Technik der vergleichenden Messung der Photosynthese mittels URAS und ihre Anwendung auf die Untersuchung periodischer Photosynthesekurven. Gartenbauwiss. **20**, 58—91 (1955).
- Endogener Rhythmus und CO₂-Stoffwechsel bei Pflanzen mit diurnalem Säurerhythmus. Planta (Berl.) **56**, 28—70 (1961).
- Temperatur und Kohlendioxid-Stoffwechsel bei *Bryophyllum daigremontianum*. Port. Acta biol. A **6**, 298—358 (1962).

- RANSON, S. C., and M. THOMAS: Crassulacean acid metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **11**, 81—110 (1960).
- RAUH, W.: Die großartige Welt der Sukkulente. Hamburg und Berlin: Paul Parey 1967.
- RHYTHER, J. H.: Interrelation between photosynthesis and respiration in the marine flagellate, *Dunaliella euehlor*a. *Nature (Lond.)* **178**, 861—863 (1956).
- SIMONIS, W., u. H. GIMMLER: Eine Methode zur Trennung von ³²P-markierten Phosphatestern und ¹⁴C-markierten Photosyntheseprodukten durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie. *J. Chromat.* **19**, 440—442 (1965).
- THOMAS, M., and S. C. RANSON: Physiological studies on acid metabolism in green plants. III. Further evidence of CO₂-fixation during dark acidification of plants showing crassulacean acid metabolism. *New Phytol.* **53**, 1—27 (1954).
- VRIES, H. DE: Über die periodische Säurebildung der Fettpflanzen. *Bot. Ztg.* **42**, 337—344 (1884).
- WOLF, J.: Der diurnale Säurerhythmus. In: RUHLAND, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. XII/2. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Dr. MANFRED KLUGE

Botanisches Institut der Technischen Hochschule
61 Darmstadt, Roßdörfer Str. 140