

## Untersuchungen über den Efflux von Malat aus den Vacuolen der assimilierenden Zellen von *Bryophyllum* und mögliche Einflüsse dieses Vorganges auf den CAM\*

M. Kluge und B. Heininger

Botanisches Institut der Technischen Universität  
D-8000 München 2, Arcisstraße 21, Federal Republic of Germany

Eingegangen am 22. Mai 1973

### Studies on the Efflux of Malate from the Vacuoles of the Assimilating Cells in *Bryophyllum* and the Possible Effects of this Process on Crassulacean Acid Metabolism

*Summary.* Kinetic studies on the release of [ $^{14}\text{C}$ ] malate into unlabelled buffer in tissue slices of *Bryophyllum* leaves labelled by  $^{14}\text{CO}_2$  dark fixation showed a curve characterized by three phases. According to literature, these phases indicate malate efflux from free space, cytoplasm and vacuoles. From the curves obtained it could be estimated that the cytoplasmatic pool of [ $^{14}\text{C}$ ] malate after  $^{14}\text{CO}_2$  dark fixation is higher in "acidified" tissue (i.e. high malate content) than in "deacidified" tissue (i.e. low malate content). Efflux of [ $^{14}\text{C}$ ] malate from the vacuoles is also higher in "acidified" tissue. It increases when the malate solution enclosed in the vacuoles becomes more concentrated. This could be demonstrated in experiments in which water was extracted from the labelled tissue by raising the osmotic potential of the buffers in which the tissue slices were suspended. The increase of [ $^{14}\text{C}$ ] malate efflux from the vacuoles followed a sigmoid curve when plotted against the osmotic potential of the washing buffer, i.e. against the degree of dehydration of the tissue.

The osmotic potential of the buffer in which leaf tissue of *Bryophyllum* was suspended also had an effect on the distribution of radiocarbon among the metabolites when the tissue was allowed to fix  $^{14}\text{CO}_2$  in the light. In deacidified tissue the incorporation of  $^{14}\text{C}$  into malate was inhibited whereas label found in carbohydrates (starch + sucrose) remained nearly unchanged when the osmotic potential of the buffer increased up to 12 atm. This effect is explained in terms of inhibition of PEP-carboxylase by a growing cytoplasmic malate pool, which is caused by the increasing malate efflux from the vacuole and by retarded malate flux from cytoplasm into vacuole under these conditions. However, in acidified tissue labelling of malate was already low with no osmotic stress, and no further inhibition of malate synthesis could be observed when the osmotic potential of the buffer was increased.

Label found in starch after  $^{14}\text{CO}_2$ -fixation decreased in the light under osmotic stress, with more label being transferred into sucrose. This effect could be interpreted as osmoregulation which forces the cells of the leaf tissue to produce osmotically effective substances to balance the higher osmotic potential of the buffer.

\* Abkürzungen und Symbole: CAM = Crassulacean Acid Metabolism, FW = Frischgewicht, PEP = Phosphoenolpyruvat,  $\pi^*$  = potentieller osmotischer Druck.

## I. Einleitung

Bei der Regulation des für viele Succulenten typischen CAM (zusammenfassende Lit.: u. a. Ting, 1971; Kluge, 1972) wird der Äpfelsäure eine Schlüsselfunktion zugeschrieben. Hoher Malatgehalt in den Zellen des Assimilationsparenchyms, der sich im Verlaufe der Nacht als Folge der von der PEP-Carboxylase katalysierten  $\text{CO}_2$ -Dunkelfixierung aufbaut, soll negativ auf die Aktivität der PEP-Carboxylase zurückwirken. Damit wird am Tage einerseits der Abbau des Malatvorrates ermöglicht, andererseits auch die PEP-Carboxylase als Konkurrent um das  $\text{CO}_2$  gegenüber dem Calvin-Cyclus geschwächt und damit die Kohlenhydrat-synthese gefördert (vgl. Kluge, 1969).

Bei einer derartigen Regulation der PEP-Carboxylaseaktivität kann nur die im Cytoplasma — also am Ort des Enzyms — herrschende Äpfelsäurekonzentration direkt wirken. Es ist jedoch möglich, daß der cytoplasmatische Malatspiegel vom Füllstand der eigentlichen Malatspeicher — den Vacuolen — kontrolliert wird. Diese indirekte Beteiligung der Vacuolen an der Regulation der PEP-Carboxylaseaktivität setzt voraus, daß entweder der Transport von Malat aus dem Cytoplasma in die Vacuole oder der Malattransport aus der Vacuole ins Cytoplasma, wahrscheinlich aber beide Vorgänge (vgl. Lüttge, 1969), von der Konzentration der in den Vacuolen vorliegenden Malatlösung beeinflußt werden.

Experimentelle Daten über den Transport von Malat zwischen Cytoplasma und Vacuole im Zusammenhang mit dem CAM fehlen bisher vollständig. Die vorliegende Arbeit soll beitragen, diese Lücke zu schließen. Es wird versucht, erste Anhaltspunkte über die Abhängigkeit des Malatefflux aus der Vacuole von der Malatkonzentration des Vacuolensaftes und die Auswirkung dieses Malatflusses auf den Stoffwechsel zu erhalten.

## II. Material und Methoden

a) *Pflanzenmaterial*. Alle Experimente wurden an 0,5 mm dicken Querschnitten durch Assimilationsorgane von *Bryophyllum daigremontianum* und *B. tubiflorum* durchgeführt. Dieses Material ließ sich in größeren Mengen durch Schneiden auf einem mit einer Rasierklinge bestückten Hobel herstellen. Die Schnitte fielen direkt in mit Luft durchperltetes dest. Wasser, wurden damit wiederholt gewaschen und schließlich in ebenfalls belüftetem „Grundpuffer“ (Bicin 50 mM,  $\text{CaSO}_4$  0,5 mM, pH 6,8) suspendiert.

Angesäuertes Gewebe (hoher Malatgehalt) wurde aus abgeschnittenen Assimilationsorganen erhalten, die sich bis zum Schneiden für 12 h bei 15°C im Dunkel befunden hatten, abgesäuertes Gewebe (niedriger Malatgehalt) dagegen aus 12stündig vorbelichteten Assimilationsorganen (20000 Lux, 25°C).

b) Messung des Vacuolenefflux. Der Efflux von Malat aus den Vacuolen wurde in Anlehnung an Pitman (1963, vgl. auch Lüttge, 1969) gemessen. Dabei wird der Austritt von radioaktivem Malat aus den durch  $^{14}\text{CO}_2$ -Dunkelfixierung markierten Gewebescheibchen in den zunächst nicht radioaktiven, die Gewebescheibchen

umspülden Puffer zeitlich verfolgt. Der dritte Abschnitt der sich dabei ergebenden dreiphasigen Kurve spiegelt das Ausmaß des Vacuolenefflux wider (vgl. Lüttge, 1969). Wir verfahren wie folgt: 10 g Gewebe wurden in 50 ml Grundpuffer unter Belüftung mit  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  (400  $\mu\text{Ci}$ , spez. Akt. 60  $\text{mCi}/\text{mmol}$ ) 1 h im Dunkel bei 20°C inkubiert. Nach dieser Zeit hatte das Gewebe 90% der Radioaktivität in Malat, 7% in Citrat und 3% in Aminosäuren eingebaut.

Nach der  $^{14}\text{CO}_2$ -Fütterung wurde das Gewebe schnell mehrmals mit Grundpuffer gewaschen und sofort in die „Auswaschgefäße“ (zylindrische Scheidetrichter mit grober Glasritze) eingewogen. In den Gefäßen befanden sich schließlich je 10 ml Grundpuffer und ca. 1 g Gewebe. Die Proben wurden bei 4°C im Dunkel leicht geschüttelt, der Puffer in den vom Experiment geforderten Zeitabständen gewechselt und seine Radioaktivität in aliquoten Volumina mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Am Ende der Auswaschperiode wurde das Gewebe mehrmals mit heißem Wasser extrahiert und die Radioaktivität dieser Extrakte gemessen. Aus diesen Daten konnte die Radioaktivität im Gewebe vor Beginn des Auswaschens berechnet werden.

In Experimenten, bei denen nur der Vacuolenefflux und nicht die gesamte Auswaschkurve von Interesse war, wurde das markierte Gewebe nach  $^{14}\text{CO}_2$ -Fütterung zunächst im Gesamten in einem großen Volumen Grundpuffer (3 l/10 g Gewebe) für 12 h bei 4°C unter Belüftung und leichtem Schütteln ausgewaschen. Erst dann verteilten wir das Gewebe auf die Auswaschgefäße und verfolgten das Auswaschen zeitlich. Die Erhöhung des osmotischen Wertes des Waschpuffers wurde durch Zugabe von Sorbit zum Grundpuffer erreicht, der endgültige osmotische Wert des Puffers kryoskopisch bestimmt.

c)  $^{14}\text{CO}_2$ -Fütterung des Gewebes im Licht unter osmotischer Belastung. Das Gewebe wurde in Bechergläschen in Grundpuffer suspendiert (400 mg/6 ml). Der Puffer enthielt jedoch in den einzelnen Ansätzen unterschiedliche Mengen von Sorbit als Osmoticum. Die Bechergläschen mit den Proben wurden auf einem Wasserbad (20°C) geschüttelt und von oben beleuchtet (Phillips Argaphot BM 500 W). Die Lichtintensität auf Höhe der Proben betrug 16000 Lux.

Nach 30 min Vorinkubation unter den genannten Bedingungen wurde zu jeder Probe  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  pipettiert (10  $\mu\text{Ci}$ ; spez. Akt. 1,11  $\text{mCi}/\text{mmol}$ ). Nach 15 min  $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung wurde das Gewebe schnell vom Suspensionsmedium getrennt und in siedendes Methanol überführt. Aliquots des Suspensionsmediums wurden nach Ansäuern mit Essigsäure eingetrocknet, in  $\text{H}_2\text{O}$  rückgelöst und die Radioaktivität gezählt. Die Weiterverarbeitung des abgetöteten Gewebes (Extraktion, Messung der eingebauten Radioaktivität, Chromatographie und Auswertung der Chromatogramme) wurde bereits früher (Kluge, 1969) beschrieben. Die in der unlöslichen Stärke verbleibende Radioaktivität bestimmten wir nach Kluge *et al.* (1973).

d) *Analytische Methoden.* Malat wurde enzymatisch bestimmt (vgl. Kluge, 1968). Preßsäfte stellten wir durch Auspressen von schnell gefrorenem und wieder aufgetautem Blattmaterial her. Die Osmolarität der Preßsäfte und Puffer bestimmten wir kryoskopisch mit dem Digitalosmometer (Fa. Schulze, Heuerbach).

### III. Ergebnisse und Diskussion

#### a) *Der Verlauf der Ausscheidung von [ $^{14}\text{C}$ ]-Malat aus den Gewebeschnitten*

Das Auswaschen von Radioaktivität aus den durch  $^{14}\text{CO}_2$ -Dunkelfixierung vorwiegend im Malat markierten Gewebe von *Bryophyllum* folgt einer Zeitkurve, wie sie ähnlich auch für anderes Pflanzenmaterial

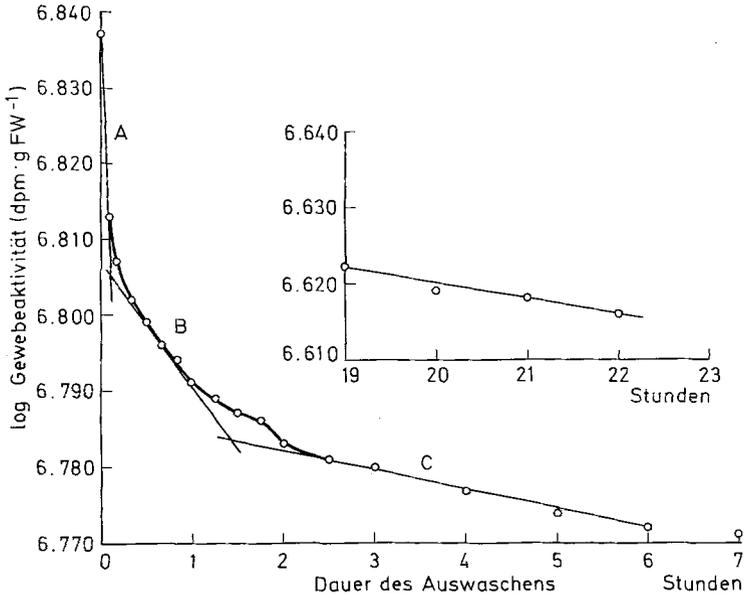


Abb. 1. Verlauf des Auswaschens von  $^{14}\text{CO}_2$ -Radioaktivität aus dem Blattgewebe von *Bryophyllum daigremontianum* (abgesäuert) nach  $^{14}\text{CO}_2$ -Dunkelfixierung

beschrieben wurde (vgl. Lüttge, 1969, dort weitere Literatur). Es lassen sich drei Phasen erkennen (A, B, C der Abb. 1). Phase A und B sind nach 4 h abgeschlossen. Danach (Phase C) ändert sich die Rate des  $^{14}\text{C}$ -Efflux auch während der folgenden 20 h, in denen weiter beobachtet wurde, nicht mehr wesentlich. Wir betrachten, gestützt auf die bei Lüttge (1969) begründeten Auffassungen, Phase A als durch das Auswaschen des „free space“, Phase B als durch das Auswaschen des Cytoplasma und Phase C schließlich durch das Auswaschen der Vacuole geprägten Abschnitt der Zeitkurve.

Unter „Vacuolenefflux“ wird daher im folgenden das Abgeben von Radioaktivität an den Suspensionspuffer durch  $^{14}\text{C}$  markiertes Gewebe nach einer Waschdauer von mindestens 12 h verstanden. Es ist erlaubt, hier von Malatefflux aus der Vacuole zu sprechen, da die in dieser Phase des Auswaschens abgegebene Radioaktivität praktisch ausschließlich in Malat eingebaut war. Bei der in Abb. 1 dargestellten Auswaschkurve fällt eine Schulter auf, die wir jedoch in keinem anderen unserer Experimente feststellen konnten. Derartige Abweichungen von einer rein dreiphasigen Kurve wurden auch von Pallaghy *et al.* (1970) und Lüttge u. Pallaghy (1972) beim Auswaschen von  $\text{K}^+$ -Ionen aus Wurzelsegmenten und *Mnium*-Blättchen beobachtet und als Indiz zweier cytoplasmatischer

Tabelle 1. *Bryophyllum daigremontianum*. Die „Halbwertszeit“ des Malatefflux aus der Vacuole im an - bzw. abgesäuerten Blattgewebe. Das im jeweiligen Experiment verwendete Gewebe stammt vom Blatt bzw. Gegenblatt der gleichen Pflanze

Nr. des Experiments	Halbwertszeit (h) des Malatefflux aus den Vacuolen		Malatgehalt des Vacuoleninhaltes ( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ Preßsaft)	
	„angesäuert“	„abgesäuert“	„angesäuert“	„abgesäuert“
1	8,7	41,0	26,5	8,6
2	43,0	66,4	18,0	4,0
3	47,0	280,0	nicht bestimmt	
4	44,0	104,0	18,0	11,2

Kompartimente gewertet. Wir vermögen nicht zu entscheiden, ob unser Befund diese Interpretation stützt.

Wir konnten keine augenfällige Abweichung vom dreiphasigen Verlauf der Auswaschkurven finden, wenn wir das Verhalten von an- bzw. abgesäuertem Gewebe verglichen. Die Rate des Malatefflux aus der Vacuole war im angesäuerten Gewebe jedoch stets höher als im abgesäuerten Material (Tabelle 1). Führt man anhand der vollständigen Effluxkurven eine Kompartimentsanalyse durch (vgl. Lüttge, 1969), so läßt sich überschlagen, daß nach der einstündigen  $^{14}\text{C}$ -Dunkelfixierung im *angesäuerten* Gewebe 77% der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in den Vacuolen, 13% im Cytoplasma und 10% im „free space“ lokalisiert waren. Demgegenüber gilt für *abgesäuertes*, von der gleichen Pflanze stammendes Gewebe: 90% der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in den Vacuolen, 5% im Cytoplasma und 5% im „free space“. Der Vergleich dieser Daten läßt eine gewisse Anreicherung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität (gewiß weitgehend identisch mit [ $^{14}\text{C}$ ] Malat) im Cytoplasma des angesäuerten Gewebes erkennen. Als Ursache dieses Effekts ist denkbar, daß der hohe Malatpegel in der Vacuole entweder den Transport des im Cytoplasma gebildeten Malats in die Vacuole erschwert oder den Transport in umgekehrter Richtung fördert, oder daß sich beide Faktoren in ihrer Wirkung addieren. In der hier vorliegenden Arbeit wird die zweite der angeführten Möglichkeiten näher untersucht.

#### b) Der Malatefflux aus der Vacuole unter osmotischer Belastung

Durch Überführen des markierten und Phase C des Auswaschens durchlaufenden Gewebes in Puffer mit erhöhter Saugspannung (hervorgerufen durch Zugabe von Sorbit) sollte dem Gewebe Wasser entzogen und damit die Konzentration der in den Vacuolen vorliegenden wäßrigen Lösung erhöht werden. Wir wollten erfahren, ob dabei die Rate des Malatefflux entsprechend der Konzentrationszunahme des Vacuolen-

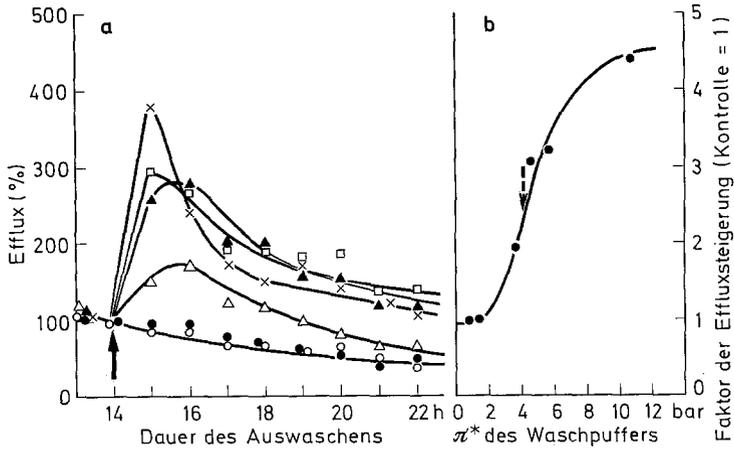


Abb. 2a u. b. *Bryophyllum daigremontianum*. a Steigerung des Malatefflux aus der Vacuole durch Erhöhung des osmotischen Wertes des Waschpuffers zum Zeitpunkt  $\uparrow$ . 100% = die Effluxrate zum Zeitpunkt  $\uparrow$ .  $\pi^*$  der Waschpuffer:  $\circ$  = 0,965 bar (Kontrolle),  $\bullet$  = 1,32 bar,  $\blacktriangle$  = 3,49 bar,  $\blacktriangle$  = 4,21 bar,  $\square$  = 5,30 bar,  $\times$  = 10,12 bar. b Abhängigkeit der am Ende der ersten Stunde nach Änderung des osmotischen Wertes des Waschpuffers erhaltenen Steigerung des Malatefflux vom osmotischen Wert ( $\pi^*$ ) des Waschpuffers. Kontrolle = 1.  $\downarrow$  = Osmotischer Wert des aus den Blättern vor dem Schneiden erhaltenen Preßsaftes

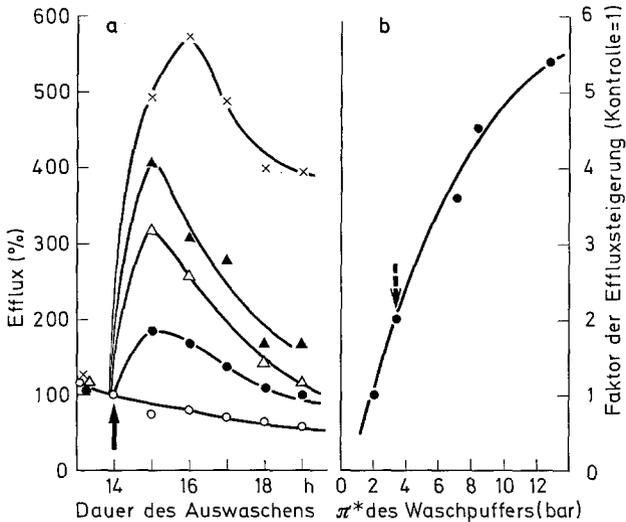


Abb. 3a u. b. *Bryophyllum tubiflorum*. Sonst Text wie Abb. 2

inhaltes, in unserem Falle also der in den Vacuolen eingeschlossenen Malatlösung, ansteigt.

Es zeigte sich, daß bei plötzlichem Wasserentzug der Vacuolenefflux tatsächlich, und zwar sprunghaft, zunimmt (Abb. 2, 3), um sich in den folgenden Stunden wieder dem ursprünglichen Ausmaß zu nähern. Eine Konzentrierung der vom Tonoplasten umschlossenen Malatlösung wird also mit einem gesteigerten Transport von Malat aus der Vacuole heraus beantwortet, und es ist anzunehmen, daß dies auch *in vivo* der Fall ist, wenn in Folge der CO<sub>2</sub>-Dunkelfixierung der Äpfelsäuregehalt der Vacuolen während der Nacht zunimmt. Für diese Annahme spricht auch unser Befund, daß im natürlich angesäuerten Gewebe der Malatefflux aus der Vacuole stets höher ist als im abgesäuerten.

Es wurde dünnschichtchromatographisch gesichert, daß nach der Applikation des Osmoticums die vom Gewebe abgegebene <sup>14</sup>C-Aktivität wiederum praktisch ausschließlich im Malat anzutreffen war, so daß auch in dieser Phase des Experiments die Abgabe von Radioaktivität in den Puffer den Malatefflux aus der Vacuole widerspiegelt.

Das Ausmaß der Steigerung des Malatefflux aus der Vacuole hängt vom osmotischen Wert des Waschpuffers, d. h. vom Ausmaß des Wasserentzugs aus dem Gewebe, ab. Trägt man die in der ersten Stunde nach Erhöhung der Saugkraft des Waschpuffers erzielte Steigerung des Malatefflux gegen den potentiellen osmotischen Wert des Waschpuffers in ein Diagramm ein (Abb. 2, b), so ergibt sich in den meisten Fällen eine sigmoide Kurve. Gelegentlich verläuft diese Kurve zunächst linear und biegt erst im Bereich höherer osmotischer Werte ab (Abb. 3, b). Der sigmoide Verlauf der meisten dieser von uns erhaltenen Dosis-Effekt-Kurven erinnert an die Substratsättigungskurven gewisser Enzyme in Gegenwart eines allosterischen Aktivators, so daß man an eine Aktivierung von „Transportstellen“ (Carriermolekülen?) im Tonoplasten durch die steigende Konzentration der aus der Vacuole herauszutransportierenden Moleküle denken könnte.

Es muß in weiteren Experimenten geklärt werden, ob außer Malat auch andere im Vacuolensaft gelösten Stoffe (z. B. Citrat) bei Konzentrationsanstieg verstärkt aus den Vacuolen ausfließen. Daß der intakte Tonoplast hier durchaus zu differenzieren vermag, lehrt u. a. das Beispiel der Anthocyane, die bekanntlich selbst bei starkem Wasserentzug nicht aus der Vacuole entlassen werden und daher bei Plasmolyseexperimenten zur Darstellung dieses Zellkompartiments dienen können.

Andererseits wird über den erhöhten Efflux von H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und „UV absorbierenden Substanzen“ aus Scheibchen angewelkter Tabakblätter berichtet (Graziani u. Livne, 1971). Unter der noch zu bestätigenden Voraussetzung, daß es sich hier ebenfalls um einen Efflux aus der Vacuole handelt, könnte dieser Effekt mit unseren Befunden vergleichbar sein.

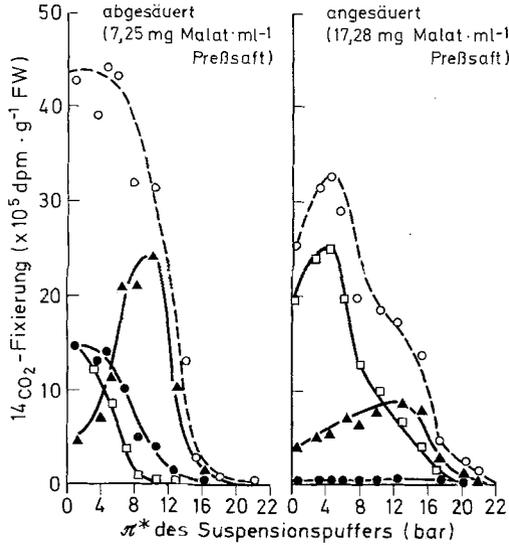


Abb. 4. Die Verteilung der  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität auf die Produkte der  $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung im Licht unter osmotischer Belastung des Gewebes (*B. daigremontianum*)

c) Die Markierungsmuster nach  $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung im Licht durch osmotisch belastete Gewebescheibchen

Nachdem sich gezeigt hatte, daß durch osmotische Belastung des Gewebes ein erhöhter Malatefflux aus den Vacuolen zu erreichen war, sollte geprüft werden, ob man durch diese Maßnahme auch Einfluß auf den Weg des Kohlenstoffs bei der  $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung im Licht zu nehmen vermag. Wir erwarteten, daß bei sich steigernder osmotischer Belastung die Apfelsäure im Verhältnis zu Kohlenhydraten zunehmend schwächer markiert würde. Diese Voraussage fußt auf der Annahme, daß der bei Wasserentzug erhöhte Malatefflux aus der Vacuole den Malatspiegel im Cytoplasma ansteigen läßt und damit das die Malatsynthese einleitende Enzym (PEP-Carboxylase) hemmt (Kluge u. Osmond, 1972).

Wie Abb. 4 zeigt, wurde diese Prognose bei abgesäuertem Gewebe bestätigt. Wir beobachteten hier tatsächlich einen Rückgang der Malatmarkierung bei Anstieg des osmotischen Wertes des Suspensionspuffers. Gleichzeitig nahm die Markierung der Zucker zu. Wird der osmotische Wert des Puffers in einen für *Bryophyllum* unphysiologischen Bereich verschoben ( $> 12$  atm), geht auch die Markierung der Zucker<sup>1</sup> zurück.

<sup>1</sup> Es handelt sich hier vorwiegend um Saccharose, die wir vor der chromatographischen Auftrennung mit Invertase abbauen (vgl. Kluge, 1969) und die daher in Form ihrer Spaltprodukte erfaßt wird.

Im angesäuerten Gewebe war dagegen keinerlei Änderung im Ausmaß der Malatmarkierung zu beobachten. Hier war der Einbau von  $^{14}\text{C}$  in Malat selbst ohne osmotische Belastung drastisch reduziert und durch Wasserentzug aus dem Gewebe nicht mehr weiter hemmbar. Dies ist verständlich, wenn man den im angesäuerten Gewebe erhöhten Malatefflux aus der Vacuole und den damit erhöhten Malatspiegel im Cytoplasma (vgl. Abschnitt III, a) in Rechnung stellt. Er dürfte damit im angesäuerten Gewebe von vornherein zu einer Hemmung der PEP-Carboxylase kommen.

Nicht zuletzt die Unterschiede im Verhalten des ab- bzw. angesäuerten Gewebes weisen darauf hin, daß die Änderung der Malatsynthese unter osmotischer Belastung tatsächlich auf Vacuoleneffekte und nicht etwa auf Chloroplasten, Mitochondrien oder andere Zellorganellen betreffende Einflüsse zurückzuführen ist. Bezeichnenderweise bedarf es wesentlich höherer osmotischer Belastung, um die ohne Beteiligung der Vacuole in den Chloroplasten ablaufende Synthese von Kohlenhydraten (Zucker + Stärke) ähnlich stark zu hemmen wie die Malatbildung. Auch eine direkte Hemmung der für die Malatsynthese unmittelbar verantwortlichen Enzyme (PEP-Carboxylase, Malatdehydrogenase) durch den Wasserentzug kann nicht die Ursache für die bei osmotischer Belastung rückläufige Malatmarkierung sein. Wir haben festgestellt, daß die beiden genannten Enzyme (isoliert und getestet nach Kluge u. Osmond, 1972) selbst bei einer Sorbitkonzentration von 1,0 osmol. im Testpuffer volle Aktivität zeigten. Eine Verfälschung der Markierungsmuster durch bevorzugten Efflux von  $^{14}\text{C}$  Malat in den Puffer während der  $^{14}\text{CO}_2$ -Fütterung ist nicht gegeben. Es wurde stets weniger als 1 % des gesamten fixierten Radiokohlenstoffs vom Gewebe ausgeschieden.

Wir werten somit die Ergebnisse der Efflux- und  $^{14}\text{CO}_2$ -Fütterungsversuche als Stütze der Hypothese, die besagt, daß der Füllstand der Malatspeicher (Vacuolen) über die Intensität des Malatefflux den cytoplasmatischen Malatspiegel und damit indirekt die Aktivität der PEP-Carboxylase (d. h. der Malatsynthese) kontrolliert. Wir sind uns bewußt, daß die Größe des cytoplasmatischen Malatpools sicher auch vom Malattransport in die Vacuole, dieser wahrscheinlich ebenfalls geprägt vom Füllstand der Malatspeicher, abhängt. Dieses Problem wurde jedoch zurückgestellt und ist Gegenstand künftiger Untersuchungen.

Die Experimente mit  $^{14}\text{CO}_2$ -fixierenden Gewebescheibchen erbrachten noch ein bemerkenswertes Nebenergebnis. Osmotisch belastetes ab- bzw. angesäuertes Gewebe verhält sich nämlich auch unterschiedlich in der Verteilung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität zwischen den Zuckern und der Stärke nach  $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung im Licht. Im abgesäuerten Material geht die Markierung der Stärke bei zunehmender osmotischer Belastung zugunsten der Zucker sofort stark zurück (Abb. 4). Im angesäuerten Gewebe da-

gegen ist einerseits die Markierung der Stärke überhaupt ausgeprägter. Zudem bedarf es wesentlich höherer osmotischer Belastung, um ihren Markierungsanteil zugunsten der Zucker zurückzudrängen (Abb. 4).

Die bei osmotischer Belastung auf Kosten der Stärkesynthese geförderte Bildung freier Zucker (vor allem Saccharose) könnte als Osmoregulation verstanden werden, denn durch die verstärkte Synthese osmotisch wirksamer Substanzen in den Zellen wird die Erhöhung der Saugspannung des Suspensionsmediums wenigstens teilweise kompensiert. Hier ergeben sich interessante Ähnlichkeiten mit dem Verhalten von *Ochromonas* unter osmotischer Belastung (Schobert *et al.*, 1972). Auch bei intakten höheren Pflanzen können sich in manchen Fällen unter Wasserstreß osmotisch wirksame Kohlenhydrate auf Kosten der Stärke anreichern (vgl. u. a. Mothes, 1956). Unsere Befunde zeigen, daß dieser Effekt nicht auf einer gesteigerten Hydrolyse der Stärke beruhen muß, sondern daß unter osmotischer Belastung bereits bei Synthese der Kohlenhydrate von der vorzugsweisen Bildung von Stärke auf die osmotisch wirksamer Zucker umgeschaltet werden kann. Dieses Phänomen wird von uns derzeit weiter untersucht.

Die Frage, warum im angesäuerten *Bryophyllum*-Gewebe eine wesentlich höhere osmotische Belastung als im abgesäuerten Gewebe erforderlich zu sein scheint, um die Saccharosesynthese über die Stärkesynthese dominieren zu lassen, muß vorläufig unbeantwortet bleiben.

Der Wasserentzug durch das Osmoticum Sorbit wirkt sich auch auf das Ausmaß der  $^{14}\text{CO}_2$ -Lichtfixierung durch *Bryophyllum*-Gewebe (Abb. 4) aus, und zwar ähnlich, wie dies für die Photosyntheseraten welkender Blätter (Catsky, 1965), die Ionenaufnahme durch Maiswurzelsegmente und die  $\text{O}_2$ -Produktion durch photosynthetisierende *Elodea*-Blättchen unter osmotischer Belastung (beides Falk *et al.*, 1966) beschrieben wurde. Hier wie auch in den meisten unserer Experimente kommt es bei leichtem Wasserentzug zunächst zu einer Förderung. Wir vermögen diesen Effekt derzeit noch nicht zu erklären. Eine deutliche Hemmung der  $^{14}\text{CO}_2$ -Bindung tritt erst bei höherer osmotischer Belastung ein.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für großzügige Unterstützung und Frau Christa Kriebitzsch für zuverlässige technische Assistenz.

### Literatur

- Catsky, J.: Water saturation deficit and photosynthetic rate as related to leaf age in the wilting plant. In: Water stress in plants, p. 203—209 (Slavic, B., ed.). The Hague 1965
- Falk, H., Lüttge, U., Weigl, J.: Untersuchungen zur Physiologie plasmolyzierter Zellen. II. Ionenaufnahme,  $\text{O}_2$ -Wechsel, Transport. Z. Pflanzenphysiol. **54**, 446—462 (1966)

- Graziani, J., Livne, A.: Dehydration, water fluxes and permeability of tobacco leaf tissues. *Plant Physiol.* **48**, 575—579 (1971)
- Kluge, M.: Untersuchungen über den Gaswechsel von *Bryophyllum* während der Lichtperiode. II. Beziehungen zwischen dem Malatgehalt des Gewebes und der CO<sub>2</sub>-Aufnahme. *Planta (Berl.)* **80**, 359—377 (1968)
- Kluge, M.: Veränderliche Markierungsmuster bei <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Fütterung von *Bryophyllum tubiflorum* zu verschiedenen Zeitpunkten der Hell-Dunkel-Periode. *Planta (Berl.)* **88**, 113—129 (1969)
- Kluge, M.: Die Sukkulente: Spezialisten im CO<sub>2</sub>-Gaswechsel. *Biol. in unserer Zeit* **4**, 120—129 (1972)
- Kluge, M., Lange, O. L., Eichmann, M. v., Schmidt, R.: Diurnaler Säurerhythmus bei *Tillandsia usneoides*: Untersuchungen über den Weg des Kohlenstoffs sowie die Abhängigkeit des CO<sub>2</sub>-Gaswechsels von der Lichtintensität, Temperatur und Wassergehalt der Pflanze. *Planta (Berl.)* **112**, 357—372 (1973)
- Kluge, M., Osmond, C. B.: Studies on phosphoenolpyruvate carboxylase and other enzymes of the Crassulacean acid metabolism of *Bryophyllum tubiflorum* and *Sedum praealtum*. *Z. Pflanzenphysiol.* **66**, 97—105 (1972)
- Lüttge, U.: Aktiver Transport (Kurzstreckentransport). In: *Protoplasmatologia, Handbuch der Protoplasmaforschung*, Bd. VIII, 7b. Alfert, M. et al. (Hrsg.). Wien-New York: Springer 1969
- Lüttge, U., Pallaghy, Ch.: Unerwartete Kinetik des Efflux und der Aufnahme von Ionen bei verschiedenen Pflanzengeweben. *Z. Pflanzenphysiol.* **67**, 359—366 (1972)
- Mothes, K.: Der Einfluß des Wasserzustandes auf Fermentprozesse und Stoffumsatz. In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. III, Ruhland, W. (Hrsg.). Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956
- Pallaghy, Ch., Lüttge, U., Willert, K. v.: Cytoplasmic compartmentation and parallel pathways of ion uptake in plant root cells. *Z. Pflanzenphysiol.* **62**, 51—57 (1970)
- Pitman, M. G.: The determination of the salt relations of the cytoplasmic phase in cells of beet root tissue. *Aust. J. biol. Sci.* **16**, 647—668 (1963)
- Schobert, B., Untner, E., Kauss, H.: Isofloridosid und die Osmoregulation bei *Ochromonas malhamensis*. *Z. Pflanzenphysiol.* **67**, 385—398 (1972)
- Ting, I.: Nonautotrophic CO<sub>2</sub> fixation and Crassulacean acid metabolism. In: *Photosynthesis and photorespiration*, M. D. Hatch et al. (eds.). New York-London-Sydney-Toronto: Wiley-Interscience 1971