

Diurnaler Säurerhythmus bei *Tillandsia usneoides*: Untersuchungen über den Weg des Kohlenstoffs sowie die Abhängigkeit des CO₂-Gaswechsels von Lichtintensität, Temperatur und Wassergehalt der Pflanze

M. Kluge, O. L. Lange, M. v. Eichmann und R. Schmid

Botanisches Institut der Technischen Universität München, D-8000 München 2,
Arcisstr. 21 und

Botanisches Institut II der Universität Würzburg, D-8700 Würzburg,
Federal Republic of Germany

Eingegangen am 28. März 1973

CAM in *Tillandsia usneoides*: Studies on the Pathway of Carbon and the Dependency of CO₂-Exchange on Light Intensity, Temperature and Water Content of the Plant

Summary. *Tillandsia usneoides*, in the common sense a non-succulent plant, exhibits CO₂ exchange characterized by net CO₂ dark fixation during the night and depression of CO₂ exchange during the day. Malate has been demonstrated to accumulate during CO₂ dark fixation and to be converted to carbohydrates in light. Thus, *T. usneoides* exhibits CAM like typical succulents.

Net CO₂ uptake during the day is increased with net CO₂ output being suppressed in duration of time and extent when light intensity increases. Furthermore, a slight increase in CO₂ fixation during the following night can be observed if the plants were treated with high light intensity during the previous day.

Curves of CO₂ exchange typical for CAM are obtained if *T. usneoides* is kept at 15°C and 20°C. Lower temperature tend to increase CO₂ uptake during the day and to inhibit CO₂ dark fixation. Temperatures higher than 20°C favour loss of CO₂ by respiration, which becomes apparent during the whole day and night at 30°C and higher temperatures. Thus, *T. usneoides* gains carbon only at temperatures well below 25°C.

Net CO₂ uptake during the day occurs only in moist plant material and is inhibited in plants kept under water stress conditions. However, CO₂ uptake during the night is clearly favoured if the plants dry out. Therefore dry plants gain more carbon than moist ones.

Curves of CO₂ exchange typical for CAM were also obtained with 13 other species of the genus *Tillandsia*.

The exhibition of CAM by the non-succulent *T. usneoides* calls for a new definition of the term "succulence" if it is to remain useful in characterizing this metabolic pathway. Because CO₂-fixing cells of *T. usneoides* possess relatively large vacuoles and are relatively poor in chloroplasts, they resembles the assimilatory cells of typical CAM-exhibiting succulents. Therefore, if "succulence" only means the capacity of big vacuoles to store malate, the assimilatory cells in *T. usneoides* are

succulent. It seems to be useful to investigate parameters which would allow a definition of the term "succulence" on the level of the cell rather than on the level of the whole plant or plant organs.

A. Einleitung

Ein gewisses Ausmaß an Succulenz der Assimilationsorgane, d.h. Vorhandensein wasserspeichernder Gewebe mit stark vacuolisierten Zellen, gilt als anatomische Voraussetzung für das Auftreten des diurnalen Säurerhythmus (oder „CAM“¹), weil die beträchtliche Menge Äpfelsäure, welche im Verlauf der Nacht über diesen Stoffwechselweg produziert wird, nur in großen Saftvacuolen ohne Gefahr für die im Cytoplasma ablaufenden Lebensvorgänge gespeichert werden kann (vgl. u.a. Nuernbergk, 1961; neuere Zusammenfassungen über CAM: Ting, 1971; Kluge, 1972).

Die Verbreitung des CAM im Pflanzenreich schien also auf die Succulenten (vor allem Vertreter der *Crassulaceae*, *Cactaceae*, u.a.) beschränkt zu sein. Um so überraschender war daher die Entdeckung von Coutinho (1969), die unabhängig davon auch in unseren Laboratorien gemacht wurde, daß die Bromeliacee *Tillandsia usneoides* ebenfalls die für den CAM typische Netto-CO₂-Dunkelfixierung zeigt (vgl. auch Benzing u. Renfrow, 1971). *T. usneoides* kann nämlich gewiß nicht als Succulente angesehen werden, wenn man den Wassergehalt ihrer Assimilationsorgane von 1,0–2,5 g pro dm² Oberfläche (Oberflächenbestimmung nach Thompson und Leyton, 1971) mit den für typische Succulente geltenden Werten von z. B. 5,1—14,9 g pro dm² (ägyptische Wüstenpflanzen: Stocker, 1928) vergleicht.

Da der Nachweis des CAM bei einer im üblichen Sinne also nicht succulenten Pflanze hoher ökologischer Spezialisierung von grundsätzlicher Bedeutung ist, schien es wünschenswert, die Befunde von Coutinho durch detaillierte Untersuchungen über den Weg des Kohlenstoffs bei der Assimilation des atmosphärischen CO₂ und über die Eigentümlichkeiten des CO₂-Austausches zu vertiefen.

B. Material und Methoden

a) *Die Versuchspflanzen.* Das Pflanzenmaterial entstammte Gewächshauskulturen der Botanischen Gärten Würzburg und München, wo es bei Temperaturen von 10–20°C, gedämpften Lichtverhältnissen und einer relativen Luftfeuchte von 70–80% gehalten wurde. Die Experimente wurden in der Phase deutlichen vegetativen Wachstums der Pflanzen durchgeführt. 6 Tage vor Beginn der vergleichenden Gaswechsellmessungen wurden die Versuchspflanzen in eine Klimatrube überführt und hier, ausgebreitet auf einem Drahtgitter, vorkultiviert, um einen einheitlichen physiologischen Zustand zu erreichen. Äußere Bedingungen bei der

1 Abkürzungen: CAM = Crassulacean Acid Metabolism; FW = Frischgewicht; TW = Trockengewicht.

Vorkultur: 20°C, Lichtintensität 10 000 Lux, 12:12 h Licht/Dunkel-Wechsel. Während der Vorkultur sorgte eine über Schaltuhr gesteuerte Sprühhvorrichtung für gleichbleibenden Wassergehalt der Versuchspflanzen. In der Regel wurden diese nahezu wassergesättigten, jedoch von äußerlich anhaftendem Wasser befreiten Pflanzen für die Gaswechsellmessungen verwendet. Für Untersuchungen über den Einfluß des Wassergehaltes des Gewebes auf den Gaswechsel wurde ein Teil des Pflanzenmaterials in einer zweiten Klimatrübe unter den obengenannten Bedingungen, jedoch ohne Besprühen, gehalten („lufttrockene“ Proben). Ein weiterer Teil wurde zusätzlich in einem Exsiccator über Kieselgel eingeschlossen („exsiccator-trockene“ Proben).

b) *Messung des Gasaustausches.* Der CO₂-Austausch der Versuchspflanzen wurde kontinuierlich mit einem URAS in Differenzschaltungen registriert (vgl. Lange, 1965). Die Versuchspflanzen befanden sich während der Messung in einer Plexiglasuvette (8 × 7,5 × 5 cm), deren Temperatur durch Untertauchen in einem thermostatisierten Wasserbad kontrolliert werden konnte und die von oben mit einer HQL-Lampe (Osram, 1000 W) beleuchtet wurde. In einigen Fällen wurde die vollklimatisierbare Gaswechseluvette der Fa. Siemens (Beschreibung vgl. Lange *et al.*, 1969) benutzt. Die Lichtintensität auf Höhe der Pflanzen betrug maximal 48 500 Lux. Sie wurde durch ein in die Cuvette eingeschlossenes Photoelement kontrolliert und konnte durch Graufilterscheiben aus Plexiglas (Röhms und Haas, Nr. GG 800) beliebig vermindert werden, ohne die Beleuchtungsgeometrie und die spektrale Zusammensetzung des Lichtes zu verändern. Für die graphischen Darstellungen des CO₂-Austausches wurden Mittelwerte über jeweils 30minütige Zeitabschnitte (Siemens-Cuvette, Abb. 1) bzw. Registrierungen mit einer 6minütigen Punktfolge (Cuvetten im Wasserbad, Abb. 3—5) verwendet.

c) *Fütterung des Gewebes mit ¹⁴CO₂, Bestimmung der radioaktiven Markierung einzelner Stoffwechselprodukte, analytische Methoden.* Zur Fütterung mit ¹⁴CO₂ vorgesehenes Pflanzenmaterial (2 g Frischgewicht je Ansatz) wurde zu Beginn der Dunkelperiode in eine Plexiglasuvette (90 ml Rauminhalt) eingeschlossen. In diese Cuvette wurde durch eine Gummimembran ¹⁴CO₂ (200 µCi, spec. Aktivität 60 mCi/mM) injiziert und dort 1 h belassen. Nach 60 min ¹⁴CO₂-Dunkelfixierung (Temperatur 20°C) entnahmen wir das markierte Pflanzenmaterial der ¹⁴CO₂-enthaltenden Cuvette, töteten 400 mg sofort in siedendem Methanol ab und brachten den Rest zur Messung des Gaswechsels in eine dem URAS angeschlossene, von normaler Luft durchströmte Cuvette. Dort verblieb er in den anschließenden 26 h. Während dieser Zeit entnahmen wir vom markierten Material laufend weitere Teilmengen, die wie beschrieben abgetötet wurden. Nach dem Abtöten extrahierten wir zunächst in siedendem Methanol und unter Homogenisieren wiederholt mit klarem Wasser. Die Extrakte wurde schließlich auf ein Volumen von 15 ml gebracht. Von dieser Lösung entnahmen wir aliquote Mengen zur Messung der Radioaktivität und des Malatgehaltes (vgl. Kluge, 1971).

Den Rest engten wir ein und trennten ihn dünnschichtchromatographisch auf (vgl. Kluge, 1971). Die durch Autoradiographie lokalisierten Flecken wurden aus den nach Bielecki u. Turner (1966) imprägnierten Chromatogrammen ausgeschnitten und mit einem Flüssigkeitszählzähler gemessen.

Zur Bestimmung der in der unlöslichen Stärke gebundenen Radioaktivität wurden die nach der Extraktion verbleibenden Rückstände der Proben nochmals wiederholt mit kaltem Wasser gewaschen. Dann fügten wir zum abzentrifugierten Rückstand 1,5 ml Acetatpuffer (16 mM pH 7.4) und 0,05 ml Amylase-Lösung (50 mg α-Amylase der Fa. Merck gelöst in 1 ml Acetatpuffer), inkubierten 2 h bei 30°C, zentrifugierten ab und bestimmten in Aliquots des Überstandes die Radioaktivität (s. oben).

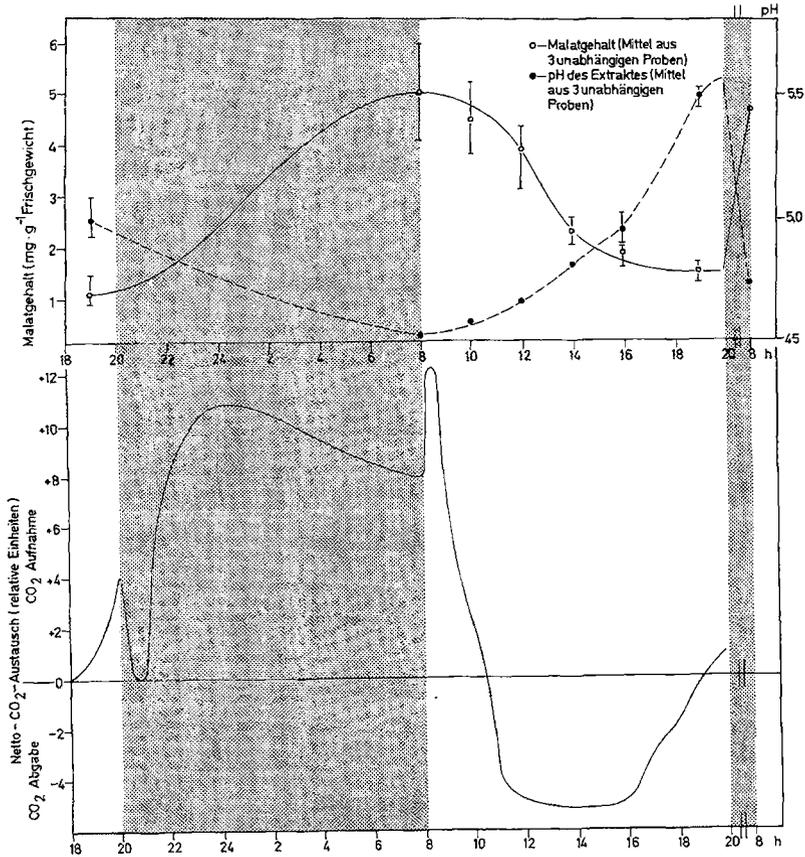


Abb. 1. Veränderungen des Malatgehaltes und des pH-Wertes des Extraktes im Tag/Nacht-Rhythmus (oberes Diagramm) und gleichzeitiger Verlauf des CO₂-Austauschs. Versuchsbedingungen: 20°C, 35000 Lux, 60% relative Luftfeuchte. Siemenscuvette

C. Ergebnisse

a) Änderungen des Netto-CO₂-Austausches und des Malatgehaltes im Licht|Dunkel-Wechsel

Die kontinuierliche Registrierung des CO₂-Austauschs bei *T. usneoides* (Abb. 1) ergab sowohl für die Licht- als auch für die Dunkelperiode Kurvenläufe, wie sie von entsprechenden Messungen an Succulenten mit CAM bekannt sind (Nuernbergk, 1961; Kluge u. Fischer, 1967). Damit ist der pauschale Nachweis einer CO₂-Dunkelfixierung bei *T. usneoides* (Coutinho, 1969) durch die Erkenntnis erweitert, daß auch bei dieser Pflanze praktisch während der ganzen Nacht apparente CO₂-Bindung auf-

Tabelle 1. Vorkommen des CAM-Gaswechsels bei verschiedenen Arten der Gattung *Tillandsia* (Nomenklatur nach Rauh, 1970). Versuchsbedingungen: 20°C, 48 500 Lux, 12:12 h Licht-Dunkelwechsel, ca. 97% rel. Luftfeuchte; Pflanzen nahezu wasser-gesättigt und von äußerlich anhaftendem Wasser befreit

Mit CAM-Gaswechsel	Ohne erkennbaren CAM-Gaswechsel
<i>Tillandsia aeranthos</i> (Loisel.) L. B. Smith	<i>Tillandsia filifolia</i> Cham.
<i>T. albida</i> Mez et Purp.	et Schlecht.
<i>T. atroviridipetala</i> Matuda	
<i>T. cf. baileyi</i> Rose	
<i>T. balbisiana</i> Schult.	
<i>T. disticha</i> H. B. K.	
<i>T. festucoides</i> Brongn.	
<i>T. funebris</i> Cast.	
<i>T. juncea</i> (Ruiz et Pav.) Poir.	
<i>T. paleacea</i> Presl	
<i>T. straminea</i> H. B. K.	
<i>T. streptocarpa</i> Baker	
<i>T. tenuifolia</i> L.	
<i>T. usneoides</i> L.	

tritt, daß diese Dunkelfixierung ein Maximum durchläuft, und daß im Licht eine Depression der Netto-CO₂-Aufnahme, ja sogar apparente CO₂-Abgabe zu beobachten ist. Ebenfalls wie bei Succulenten mit CAM häuft sich auch bei *T. usneoides* über Nacht Malat im Assimilationsparenchym an (Abb. 1), und da dieser Malatvorrat am Tage wieder verschwindet, bietet sich das typische Bild eines diurnalen Säurerhythmus (vgl. Wolf, 1960). Eine Übereinstimmung der *T. usneoides* mit CAM durchführenden Succulenten ergibt sich außerdem in der Korrelation der Gaswechselkurve mit dem Malatgehalt des Gewebes (Kluge, 1968). Die Depression im Verlauf der CO₂-Aufnahme am Tage stimmt zeitlich mit dem stärksten Abfall im Malatgehalt überein, während die CO₂-Bindung wieder ansteigt, wenn der Malatgehalt sein ursprüngliches Niveau vom Vortage erreicht hat. Der hier beschriebene Verlauf des CO₂-Austausches ist auch bei anderen Vertretern der Gattung *Tillandsia* zu beobachten (Tabelle 1). Von 15 zur allgemeinen Orientierung untersuchten Arten fehlte nur bei *Tillandsia filifolia* — unter den gewählten Versuchsbedingungen — eine Netto-CO₂-Fixierung in der Dunkelphase (bezeichnenderweise bevorzugt *Tillandsia filifolia* feuchte Standorte im Bereiche des Regenwaldes). Obwohl wir bei diesen Arten mit Ausnahme von *T. usneoides* nur den Gaswechsel, nicht aber den Gang des Malatgehaltes überprüft haben, scheint damit sicher zu sein, daß CAM innerhalb der Gattung *Tillandsia* weit verbreitet ist (vgl. auch Williams, 1970; Benzing u. Renfrow, 1971).

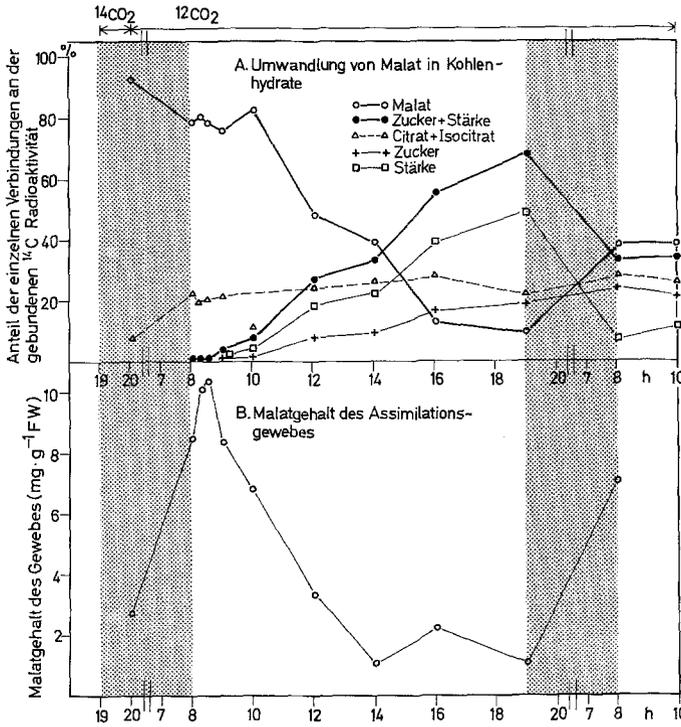


Abb. 2. Änderung des ^{14}C -Anteils in einzelnen Verbindungen nach einstündiger $^{14}\text{CO}_2$ -Dunkelfixierung und Nachkultur des Pflanze in normaler Luft. B: Gleichzeitige Veränderung des Malatgehaltes im Gewebe. Versuchsbedingungen nach der $^{14}\text{CO}_2$ -Fütterung: 20°C , 35000 Lux, 60% relative Luftfeuchte. FW Frischgewicht

b) Der Weg des bei der CO_2 -Dunkelfixierung erworbenen Kohlenstoffs

Aus Abb. 2 geht hervor, daß nach einstündiger Dunkelfixierung von $^{14}\text{CO}_2$ ca. 90% der gebundenen Radioaktivität im Malat lokalisiert sind. Auf Citrat/Isocitrat (die beiden Verbindungen sind mit unserem System nicht zu trennen) entfielen 10% des Radiokohlenstoffs, auf Fumarat, Succinat, Aspartat, Glutamat und Alanin nur Spuren (im gesamten stets weniger als 2% der Aktivität). Setzt man das ^{14}C -markierte Gewebe einer 12stündigen Dunkelperiode in Gegenwart normaler Luft aus, so sinkt der Anteil der Malat-gebundenen Radioaktivität zugunsten des Citrat/Isocitrat ab. In der sich nun anschließenden Lichtperiode wird der Abfall der Malatmarkierung wesentlich verstärkt, diesmal zugunsten von Kohlenhydraten, während der Anteil der Citrat-gebundenen Aktivität sich nicht mehr ändert. Schließt sich nochmals eine Dunkelperiode an, so steigt die Malatmarkierung auf Kosten der Kohlenhydrate wieder. An

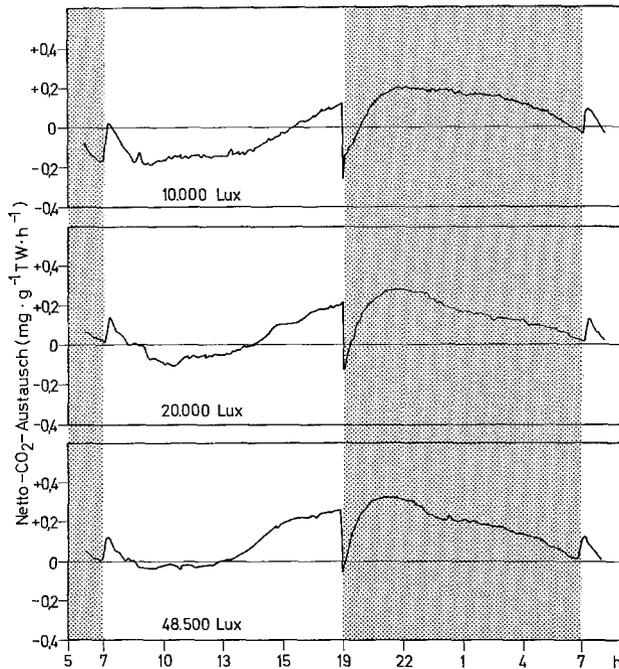


Abb. 3. Verlauf des CO_2 -Austauschs in Abhängigkeit von der während des Tages herrschenden Lichtintensität. Temperatur: 20°C

der Markierung des Citrats ändert sich auch jetzt nichts mehr. Es fällt auf, daß die Abnahme der Malat-gebundenen Radioaktivität beim Übergang Dunkel/Licht ähnlich wie bei Bryophyllum (Kluge, 1968a) erst mit einer deutlichen Verzögerung entritt. Hat sie jedoch einmal begonnen, dann fallen die Radioaktivität im Malat und der Malatgehalt des Gewebes gleichmäßig ab, d.h., während des Malatabbaus ändert sich die spezifische Radioaktivität der Äpfelsäure nicht.

c) Abhängigkeit des CO_2 -Gaswechsels von der Lichtintensität

Abb. 3 zeigt eine Auswahl aus mehreren Gaswechsellmessungen, die mit je 10000 Lux, 20000 Lux und 48500 Lux Beleuchtungsintensität durchgeführt wurden. In allen Fällen ergaben sich Kurven, die dem in Abschnitt a) beschriebenen Ablauf des CO_2 -Austausches grundsätzlich ähneln. Die Abweichungen, die sich bei Änderungen der Lichtintensität zeigten, lassen sich in folgende Punkten zusammenfassen:

1. Die Zeit der apparenten CO_2 -Aufnahme am Anfang der Lichtphase wird mit steigender Lichtintensität verlängert (hier von weniger als $1\frac{1}{2}$ h auf $2\frac{1}{2}$ h).

Tabelle 2. Der Stoffgewinn in Abhängigkeit von der Lichtintensität

Lichtintensität (Lux)	Stoffgewinn (mg CO ₂ ·g ⁻¹ TW·d ⁻¹)
10000	+ 0,31
20000	+ 1,58
48500	+ 2,57

2. Die Phase des CO₂-Ausstoßes während der Lichtperiode verkürzt sich bei Erhöhung der Lichtintensität von ca. 8 auf 3 h, so daß bei der höchsten von uns angewandten Beleuchtungsintensität die apparente CO₂-Aufnahme bereits vor Beginn der 2. Hälfte der Lichtperiode wieder einsetzt.

3. Das Ausmaß der Netto-CO₂-Abgabe im Licht verringert sich mit steigender Lichtintensität drastisch, jedoch ist selbst bei 45500 Lux zeitweise noch apparenter CO₂-Verlust meßbar.

Der Einfluß der Intensität des am Tage eingestrahnten Lichtes auf den CO₂-Austausch während der nachfolgenden Dunkelperiode beschränkt sich unter den hier gewählten Bedingungen auf den früheren Beginn und auf eine leichte Steigerung der Netto-CO₂-Dunkelfixierung bei gesteigerter Beleuchtungsstärke. Der Verlauf des CO₂-Austausch während der Nacht, insbesondere die zeitliche Lage des Maximums, ist jedoch keinen Änderungen unterworfen.

Bildet man die CO₂-Bilanzen über jeweils 24 h (Tabelle 2), so wird deutlich, daß auch bei einer Lichtintensität von 10000 Lux noch Kohlenstoffgewinn zu verzeichnen ist. Durch die unter diesen Lichtverhältnissen jedoch beträchtliche Netto-CO₂-Abgabe beträgt er jedoch nur ca. $\frac{1}{8}$ des bei 48500 Lux erzielten Gewinns.

d) Abhängigkeit des CO₂-Gaswechsels von der Temperatur

Ebenso wie typische Succulenten mit CAM zeigt *T. usneoides* (Abb. 4) bei niedrigen Temperaturen (3°C) keine apparente CO₂-Dunkelfixierung mehr (vgl. Nuernbergk, 1962; Kluge, 1969a). Die Lichtperiode ist durch dauernde Netto-CO₂-Aufnahme gekennzeichnet, so daß sich, abgesehen vom langsameren Anlaufen der CO₂-Fixierung beim Übergang Dunkel/Licht, der kurzfristigen, starken CO₂-Abgabe beim Übergang Licht/Dunkel und der sehr schwachen CO₂-Ausscheidung im Dunkel, ein dem Gaswechsel nicht succulenter Pflanzen ähnliches Bild ergibt. Bei Erhöhung der Temperatur auf 10°C tritt bereits Netto-CO₂-Dunkelfixierung auf. Im Licht bewegt sich die Kurve bei dieser Temperatur zwar stets im positiven Bereich, jedoch deutet sich hier bereits eine Depression der

Tabelle 3. Abhängigkeit der CO₂-Bilanz von der Temperatur. Lichtintensität 48500 Lux

°C	CO ₂ -Bilanz (mg CO ₂ ·g ⁻¹ TW·d ⁻¹) in der Dunkelphase	CO ₂ -Bilanz (mg CO ₂ ·g ⁻¹ TW·d ⁻¹) in der Lichtphase	CO ₂ -Gesamt-Bilanz (mg CO ₂ ·g ⁻¹ TW·d ⁻¹) über 24 h
+ 3	- 0,09	+1,03	+ 0,94
+10	+ 1,27	+0,61	+ 1,87
+15	+ 2,41	+0,47	+ 2,88
+20	+ 1,91	+0,01	+ 1,89
+25	- 0,35	-0,01	- 0,36
+30	- 3,48	-0,38	- 3,86
+35	-14,56	-1,41	-15,97

CO₂-Aufnahme an. Die Experimente mit 15°C und 20°C erbrachten die schon oben beschriebenen Kurvenbilder eines typischen CAM, wobei die apparante CO₂-Ausscheidung im Licht mit steigender Temperatur zunimmt. Bei 25°C ist der charakteristische Verlauf der Kurve zwar noch erkennbar, der Gaswechsel ist jedoch schon stark und langfristig in den Bereich der apparenten CO₂-Ausscheidung verschoben. Diese Tendenz führt dann bei 30°C und 35°C schließlich zu dauerndem CO₂-Verlust, der im Licht geringer ist als im Dunkel. Bei der höchsten Temperaturstufe gleicht der Gaswechsel im Prinzip wieder dem einer Pflanze ohne CAM.

Aus Tabelle 3 geht hervor, daß *T. usneoides* selbst bei hoher Lichtintensität (48500 Lux) nur bei Temperaturen von 20°C und darunter zu positiver Kohlenstoffbilanz befähigt ist. Bei höheren Temperaturen wird die CO₂-Fixierung im Licht als auch im Dunkel durch CO₂-Ausscheidung überkompensiert.

e) Abhängigkeit des CO₂-Gaswechsels vom Wassergehalt der Pflanzen

T. usneoides zeichnet sich durch hohe Dürresistenz aus (Biebl, 1964). Die Untersuchung des Gasaustausches in Abhängigkeit vom Wassergehalt des Gewebes versprach deshalb besonders interessante Resultate. Die Messungen wurden mit Pflanzen durchgeführt, die seit sechs Tagen vor Beginn der Experimente „exsiccator-trocken“, „lufttrocken“ und „feucht“ gehalten worden waren (vgl. Abschn. B, a). Während der Gaswechselformung sorgten wir dafür, daß sich der Wassergehalt des Gewebes nicht änderte, indem die Gaswechselcuvette von Zeit zu Zeit kurz geöffnet wurde, um die Pflanzen anzusprihen („feuchte“ Proben); bei den „luft-“ bzw. „exsiccator-trockenen“ Proben wurde der Luftstrom vor Eintritt in die Cuvette unterschiedlich stark getrocknet. Der Wassergehalt der Pflanzen betrug nach Abschluß des Experimentes 80,2% (exsiccator-trocken), 82,3% (lufttrocken) bzw. 85,7% (feucht) des Frischge-

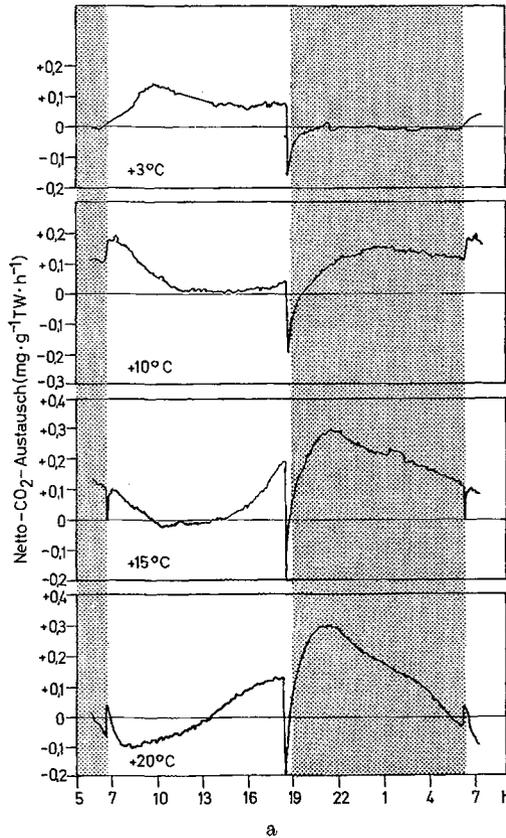


Abb. 4. Verlauf des CO₂-Austauschs in Abhängigkeit von der Temperatur. Lichtintensität: 48500 Lux. (Siehe beide Teilfiguren a und b)

wichtiges. Der Einfluß des Wassergehaltes des Gewebes auf den Verlauf des Gaswechsels ist aus Abb. 5 zu entnehmen. Es fällt auf, daß lediglich die „feuchten“ Gewebeproben im Licht zunächst deutliche CO₂-Ausscheidung und später CO₂-Aufnahme zeigen. Bei den beiden „trockenen“ Proben ist die apparente CO₂-Ausscheidung stark reduziert und kann sogar teilweise kompensiert werden (vgl. „lufttrockene“ Probe in der 2. Hälfte der Lichtperiode). Hier tritt im Licht keine Netto-CO₂-Aufnahme ein. Der für „feuchtes“ Material beim Übergang Licht/Dunkel so charakteristische Sprung in die apparente CO₂-Abgabe tritt bei den dürrebelasteten Pflanzen ebenfalls nicht auf. Bemerkenswert ist der Verlauf der CO₂-Kurve im Dunkel. In allen drei Fällen kommt es zu Netto-CO₂-Dunkelfixierung, jedoch erweist sich diese als um so stärker,

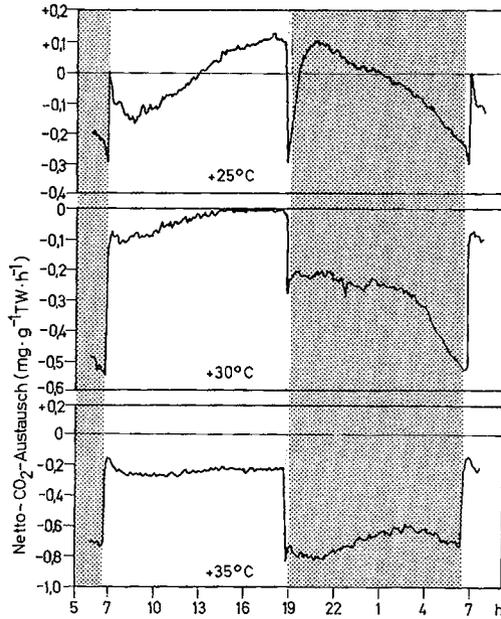


Abb. 4 b

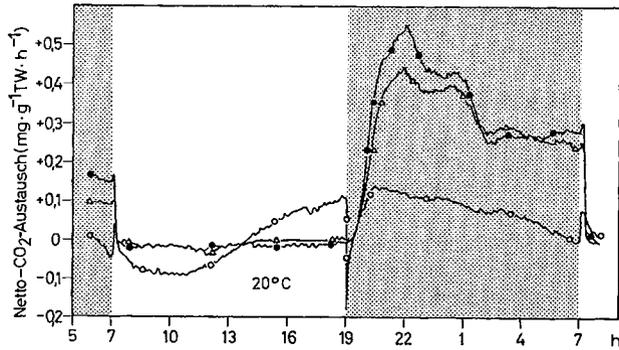


Abb. 5. Verlauf des CO_2 -Gasaustausch in Abhängigkeit vom Wassergehalt des Gewebes: \bullet — \bullet = 80,2%, \triangle — \triangle = 82,3%, \circ — \circ = 85,7% des Frischgewichtes. Lichtintensität 48 500 Lux, Temperatur: 20°C

je niedriger der Wassergehalt des Gewebes ist. Dies führt zu dem überraschenden Effekt, daß sich die Gesamt- CO_2 -Bilanz der Pflanzen bei Dürrebelastung günstiger gestaltet als bei maximaler Befeuchtung (Tabelle 4).

Tabelle 4. Abhängigkeit der CO₂-Bilanz vom Wassergehalt der Pflanzen. Lichtintensität: 48500 Lux, Temperatur: 20°C

Wasser- gehalt (% d. FW zu Versuchs- ende)	CO ₂ -Bilanz (mg CO ₂ ·g ⁻¹ TW·d ⁻¹) in der Dunkelphase	CO ₂ -Bilanz (mg CO ₂ ·g ⁻¹ TW·d ⁻¹) in der Lichtphase	CO ₂ -Gesamt-Bilanz (mg CO ₂ ·g ⁻¹ TW·d ⁻¹) über 24 h
80,2	+3,66	-0,15	+3,51
82,3	+3,44	-0,09	+3,35
85,7	+0,94	-0,08	+0,86

Diskussion

Die hier vorgelegten Ergebnisse untermauern die Angabe Coutinhos, daß *T. usneoides* eine Pflanze mit CAM ist. Wie unsere Fütterungsversuche mit ¹⁴CO₂ ergaben, wird bei der CO₂-Dunkelfixierung Kohlenstoff zunächst in Äpfelsäure festgelegt und in der folgenden Lichtperiode in Kohlenhydrate überführt. Eine geringe Menge der bei der ¹⁴CO₂-Dunkelfixierung gebundenen Radioaktivität gelangt allerdings auch in die Citronensäure/Isocitronensäure (vgl. Abb. 2). Wahrscheinlich wird ein Teil der zunächst markierten Äpfelsäure im Citronensäurecyclus umgesetzt und gibt Radiokohlenstoff an die Zwischenprodukte dieses Stoffwechselweges (also vor allem an Citrat/Isocitrat) weiter. Im Gegensatz zur Äpfelsäure scheint aber der größte Teil der nachts markierten Citronensäure im Licht dem Stoffwechsel weitgehend entzogen zu sein, da sich ihre ¹⁴C-Markierung anteilmäßig kaum mehr ändert. Setzt man voraus, daß sowohl Malat als auch Citrat/Isocitrat in der Vacuole gespeichert werden, so kann dieser Befund nur bedeuten, daß Äpfelsäure — auf welche Weise auch immer — getrennt vom Citrat aus der Vacuole entnommen wird.

Es darf wohl angenommen werden, daß wie bei den Succulenten auch hier die Umwandlung der Äpfelsäure in Kohlenhydrate durch die Decarboxylierung des Malat via malic enzyme eingeleitet wird. Das dabei endogen entstehende CO₂ (vgl. Kluge, 1968a) könnte als Substrat der Photosynthese dienen. Mit dieser Annahme ist die Depression der apparenten CO₂-Fixierung im Licht erklärbar. Sie kommt dadurch zustande, daß aus Malat gebildetes CO₂ bevorzugt vom Photosyntheseapparat verarbeitet wird und damit CO₂ der Atmosphäre verdrängt (vgl. Kluge, 1968b). Bezeichnenderweise steigt auch bei *T. usneoides* die Fixierung von atmosphärischem CO₂ an, wenn der nächtlich angehäuften Malatvorrat wieder aufgebraucht ist (vgl. Abb. 1, s. auch Kluge, 1968b).

Bei hoher Lichtintensität kann die Photosynthese das aus dem Malat stammende CO₂ offensichtlich mit hoher Rate in Kohlenhydrate über-

führen. Dies gilt jedoch nicht für Schwachlicht. Hier ist die Photosynthese nicht leistungsfähig genug, um das intermediär entstehende Kohlendioxid abzufangen. Dieses geht damit den Pflanzen verloren, wie die bei Abnahme der Lichtintensität zunehmende apparente CO_2 -Ausscheidung am Tage zeigt. Gerade dieser CO_2 -Verlust deutet an, daß die Decarboxylierung der Äpfelsäure im Gegensatz zur Photosynthese bereits bei niedriger Lichtintensität wirkungsvoll arbeitet. Sollte die Mobilisierung der Äpfelsäure ein vom Licht beeinflusster Vorgang sein (Wolf, 1960; Kluge, 1971), so zwängen unsere Ergebnisse zu der Annahme, daß für die Mobilisierung des Malat und für die Refixierung des dabei entstehenden CO_2 zwei verschiedene Lichtsättigungskurven gelten.

Die Anwendung hoher Lichtintensitäten am Tage steigert auch das Ausmaß der CO_2 -Fixierung in der folgenden Nacht etwas (vgl. Abb. 3 10000 Lux und 48500 Lux). Dieser Effekt ist wohl darauf zurückzuführen, daß bei hoher Lichtintensität der Malatverbrauch besonders intensiv ist (vgl. Wolf, 1960; Kluge, 1968 b). Der Speicherraum für Malat (Vacuolen) wird unter diesen Bedingungen also weitestgehend geleert, so daß die Speicherkapazität die CO_2 verbrauchende nächtliche Äpfelsäuresynthese nicht begrenzt.

Bei der niedrigsten von uns angewandten Temperatur (3°C) gleicht der Gaswechsel der *Tillandsia* nahezu dem einer Pflanze ohne CAM, sieht man vom langsameren Ansteigen der CO_2 -Aufnahme beim Übergang Dunkel/Licht ab. Apparente CO_2 -Dunkelfixierung tritt hier praktisch nicht auf. Die Kurve bewegt sich während der Nacht im Bereich des Kompensationspunktes. Wir können derzeit noch nicht entscheiden, ob die bei 3°C fehlende CO_2 -Dunkelfixierung auf den Temperatureigenschaften der carboxylierenden Enzyms (Brandon, 1967) oder auf der Blockierung eines für die Verfrachtung des entstehenden Malats in die Vacuole verantwortlichen Transportsystems beruht, vermuten jedoch, daß ersteres dominiert. Bei 10°C ist schon deutliche CO_2 -Dunkelfixierung zu beobachten. Die hier zunächst relative hohe CO_2 -Bindung im Licht wird zwar im Verlaufe des Tages in die Nähe des Kompensationspunktes verschoben, bleibt jedoch stets apparent. Mit der Annahme, das Malat mobilisierende Enzym sei bei 10°C noch nicht genügend aktiviert, um für die Sättigung der Photosynthese ausreichende Mengen CO_2 zu liefern, ist dieser Effekt am einfachsten zu erklären (vgl. Brandon, 1967) Bei weiterer Erhöhung der Temperatur dürfte sich das Malat verarbeitende System seinem Wirkungsoptimum so sehr nähern, daß die CO_2 -Produktion im Licht die Kapazität der Refixierung durch die Photosynthese übersteigt und es selbst bei hoher Lichtintensität zu CO_2 -Verlust kommt. Die Netto- CO_2 -Dunkelfixierung ist bei Temperaturen um 25°C und darüber beeinträchtigt, wobei offenbleibt, ob bereits das CO_2 -bindende Enzymsystem gehemmt oder die CO_2 -Fixierung durch stark gesteigerte

Atmung größtenteils kompensiert wird. Sicher beeinflußt beides den bei 30°C und 35°C ablaufenden Gaswechsel. Aufgrund dauernder starker CO₂-Produktion zehrt die Pflanze bei diesen Temperaturen bereits von ihrer Substanz, wie die durchweg negative CO₂-Bilanz zeigt (Tabelle 3).

Unsere Temperaturversuche bestätigen also die beim Studium des Gaswechsels von *Bryophyllum* gesammelten Erfahrungen (Nuernbergk, 1962; Kluge, 1971). Dies gilt vor allem für den Bereich niedriger Temperaturen. Unsere Befunde stehen in gutem Übereinklang mit denen Brandon's (1967), der für *Bryophyllum tubiflorum* nachwies, daß die Bilanz zwischen Malatsynthese und Malatabbau von den Temperaturoptima der beteiligten Enzymsystem abhängt. Danach dominiert bei 15°C und darunter die Malatbildung, bei 25°C und darüber der Malatverbrauch. Man kann schließlich aus unseren Kurven und der Tabelle 3 ableiten, daß kühle Nachttemperaturen (ca. 10—15°C) und relativ hohe Temperaturen am Tage (zwischen 20°C und 25°C) — die Photosynthese absättigende Lichtintensitäten vorausgesetzt — am günstigsten für die Kohlenstoffbilanz von *T. usneoides* sein müssen. Dies sind die Bedingungen, welche diese Pflanze an ihren natürlichen Standorten vorfinden dürfte.

Als weiterer Umweltfaktor spielt bei *T. usneoides* die Versorgung mit Wasser eine wichtige Rolle, da die Art als extremer Epiphyt keine Wurzeln besitzt und die Gewebe daher häufig Wasserdampfdefizite aufweisen (vgl. z. B. Biebl, 1964), die den Kohlenstoffgewinn beeinträchtigen könnten.

Es ist bekannt, daß der wassersparende CAM-Gaswechsel (vgl. u. a. Kluge u. Fischer, 1967; Kluge, 1972) gerade unter Dürrebelastung betont wird. Je niedriger der Wassergehalt, um so stärker wird die CO₂-Dunkelfixierung gefördert und die CO₂-Aufnahme am Tage eingeschränkt. Wir beobachteten eine Steigerung der nächtlichen CO₂-Fixierung auf das Vierfache, wenn der Wassergehalt von 85,7% auf 80,2% (s. Abschnitt C, e) absank. Benzing und Renfrow (1971) stellten bei Gaswechselformen an *Tillandsia circinata* und *T. ionantha* ebenfalls eine Förderung der CO₂-Dunkelfixierung fest, wenn das Material nach Anfeuchten abtrocknete. Sie führen diesen Effekt auf einen bei Befeuchtung zwischen den Schuppenhaaren der Blattoberfläche verbleibenden Wasserfilm zurück, der zunächst den Gaswechsel behindert und beim Abtrocknen verschwindet. Es ist anzunehmen, daß auch bei unseren „feucht“ gehaltenen Pflanzen während der Experimente zu Abschnitt C, c ein derartiger Wasserfilm auftritt. Macht man sich jedoch die Erklärung der obengenannten Autoren zu eigen, so ist unverständlich, warum der Gasaustausch im Licht von diesem Wasserfilm *nicht* beeinflußt wird. Gerade das „feuchte“ Material zeigt nämlich am Tage einen *starken* Gasaustausch, während er bei den „trockenen“ Pflanzen eingeschränkt ist. Außerdem führte, bei vielfacher Wiederholung der Experimente, eine stufenweise Erhöhung des Wasserdefizits bis zu einem bestimmten Austrocknungs-

grad bei Pflanzen ohne jegliches äußerlich anhaftendes Wasser immer zu einer Steigerung der CO₂-Dunkelfixierung.

Habituell ähneln die Zellen des Assimilationsparenchyms der *T. usneoides* stark denen succulenter Pflanzen mit CAM. Hier wie dort beobachtet man Zellen mit im Verhältnis zum Plasmaanteil großen Vacuolen und relativ geringem Chloroplastenbesatz. Eine wesentliche Voraussetzung für das Auftreten des CAM, nämlich ausreichender Speicherraum für Malat innerhalb der assimilierenden Zellen, scheint also auch bei *Tillandsia* erfüllt zu sein. Die Assimilationsorgane werden hier allerdings nur aus relativ wenigen derartigen Zellen aufgebaut (vgl. auch Coutinho, 1969). Die Blätter sind daher fadenförmig, zudem dicht bedeckt mit Schuppenhaaren und bieten somit nicht das gewohnte Bild einer Succulenten. Trotzdem hat bereits Biebl (1964) Parallelen zwischen *T. usneoides* und den Succulenten gezogen, mit denen sie außer der Wasserspeicherungsfähigkeit des dünnwandigen Parenchyms auffallend niedrige osmotische Werte, ein gegen grenzplasmolytische Eingriffe recht empfindliches Plasma und die geringe Transpirationsrate verbindet.

Wir sind nicht der Ansicht, daß die hier vorgelegten Ergebnisse zu dem Schluß zwingen, das Auftreten des CAM sei nicht an „Succulenz“ gebunden. Es scheint dies eine Frage der Definition zu sein. Uns erscheint sinnvoll, den Begriff „Succulenz“ im Zusammenhang mit dem CAM nur auf den Zustand der einzelnen Zellen des assimilierenden Parenchyms und nicht pauschal auf das ganze assimilierende Organ anzuwenden. So könnte man z.B. daran denken, als Kriterium in diesem Sinne den Raumanteil von Plasma und Vacuole miteinander in Beziehung zu setzen. Es wäre auch zu untersuchen, ob bei Pflanzen mit homogenem Bau der Assimilationsorgane unter Umständen das Verhältnis Wassergehalt/Chlorophyllgehalt brauchbare Werte zur Charakterisierung der „Succulenz“ im Zusammenhang mit CAM liefern könnte.

Das Auftreten von CAM ist nicht auf die hier eingehender untersuchte *T. usneoides* beschränkt, sondern scheint innerhalb der Gattung verbreitet zu sein (Tabelle 1; Coutinho, 1969; Williams, 1970; Benzing u. Renfrow, 1971). Die Fähigkeit zur Dunkelfixierung von CO₂ und damit zur Photosynthesetätigkeit unter möglichst geringem Wasserverlust ist hier offensichtlich mit dem Vermögen zur Wasseraufnahme durch die gesamte, stark vergrößerte Oberfläche des Vegetationskörpers zu einer besonders effektiven funktionellen Adaptation an die extremen Bedingungen des wechselfeuchten Epiphytenstandortes kombiniert.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung unserer Arbeit. Herrn Prof. Rauh, Heidelberg, danken wir für die Überlassung von Pflanzenmaterial. Die Herren Gartenmeister Meussner und Kühner führten die Kulturarbeiten im Botan. Garten Würzburg bzw. am Bot. Inst. der TU München durch.

Literatur

- Benzing, D. H., Renfrow, A.: Significance of the pattern of CO₂ exchange to the ecology and phylogeny of the *Tillandsioideae* (*Bromeliaceae*). Bull. Torrey Bot. Club **98**, 322—327 (1971).

- Biebl, R.: Zum Wasserhaushalt von *Tillandsia recurvata* L. und *T. usneoides* L. auf Puerto Rico. *Protoplasma* (Wien) **58**, 345—368 (1964).
- Bieleski, R. L., Turner, N. A.: Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin layer electrophoresis and chromatography. *Analyt. Biochem.* **17**, 278—293 (1966).
- Brandon, P. C.: Temperature features of enzymes affecting Crassulacean Acid Metabolism. *Plant Physiol.* **42**, 977—984 (1967).
- Coutinho, L. M.: Novas observacoes sobre a occorencia do „efeito de DeSassure“ e suas relacoões com a suculencia, a temperature folhear e os movimentos estomáticos. *Botanica* **27**, 77—102 (1969).
- Kluge, M.: Untersuchungen über den Gaswechsel von *Bryophyllum* während der Lichtperiode. I. Zum Problem der CO₂-Abgabe. *Planta* (Berl.) **80**, 255—263 (1968, a).
- Kluge, M.: Untersuchungen über den Gaswechsel von *Bryophyllum* während der Lichtperiode. II. Beziehungen zwischen dem Malatgehalt des Blattgewebes und der CO₂-Aufnahme. *Planta* (Berl.) **80**, 359—377 (1968, b).
- Kluge, M.: Veränderliche Markierungsmuster bei ¹⁴CO₂-Fütterung von *Bryophyllum tubiflorum* zu verschiedenen Zeitpunkten der Hell/Dunkel-Periode. I. Die CO₂-Fixierung unter Belichtung. *Planta* (Berl.) **88**, 113—129 (1969).
- Kluge, M.: Veränderliche Markierungsmuster bei ¹⁴CO₂-Fütterung von *Bryophyllum tubiflorum* zu verschiedenen Zeitpunkten der Hell/Dunkel-Periode. II. Beziehungen zwischen dem Malatgehalt des Gewebes und dem Markierungsmuster nach ¹⁴CO₂-Lichtfixierung. *Planta* (Berlin) **98**, 20—20 (1971).
- Kluge, M.: Die Sukkulenten: Spezialisten im CO₂-Austausch. *Biologie in unserer Zeit* **2**, 120—128 (1972).
- Kluge, M., Fischer, K.: Über Zusammenhänge zwischen dem CO₂-Austausch und der Abgabe von Wasserdampf durch *Bryophyllum daigremontianum*. *Planta* (Berl.) **77**, 212—223 (1967).
- Lange, O. L.: Der CO₂-Gaswechsel von Flechten bei tiefen Temperaturen. *Planta* (Berl.) **64**, 1—19 (1965).
- Lange, O. L., Koch, W., Schulze, E. D.: CO₂-Gaswechsel und Wasserhaushalt von Pflanzen in der Negev-Wüste am Ende der Trockenzeit. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **82**, 39—61 (1969).
- Mc. Williams, E.: Comparative rates of dark CO₂ uptake and acidification in the *Bromeliaceae*, *Orchidaceae*, and *Euphorbiaceae*. *Bot. Gaz.* **131**, 285—290 (1970).
- Nuernbergk, E. L.: Endogener Rhythmus und CO₂-Stoffwechsel bei Pflanzen mit diurnalem Säurerhythmus. *Planta* (Berl.) **50**, 28—70 (1961).
- Nuernbergk, E. L.: Temperatur und Kohlendioxid-Stoffwechsel bei *Bryophyllum daigremontianum*. *Port. Acta biol. A* **6**, 298—358 (1962).
- Rauh, W.: Bromelien für Zimmer und Gewächshaus, Bd. 1, die *Tillandsioideen*. Stuttgart: E. Ulmer 1970.
- Stocker, O.: Der Wasserhaushalt ägyptischer Wüsten- und Salzpflanzen. *Botan. Abh. (Jena)* **13**, 200 S. (1928).
- Thompson, F. B., Leyton, L.: Method for measuring the leaf surface area of complex shoots. *Nature* (Lond.) **229**, 572 (1971).
- Ting, I. P.: Nonautotrophic CO₂ fixation and Crassulacean Acid Metabolism. In: Hatch, Osmond and Slatyer (eds.): *Photosynthesis and photorespiration*. Wiley-Interscience: New York-London-Sydney-Toronto (1971).
- Wolf, J.: Der diurnale Säurerhythmus. In: Ruhland, W. (Hrsg.) *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. XII/2. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.