

**Zeitschrift:** Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse  
**Herausgeber:** Schweizerische Botanische Gesellschaft  
**Band:** 67 (1957)

**Artikel:** Atmung und CO<sub>2</sub>-Fixierung des Tabaks  
**Autor:** Waltz, Peter  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-47092>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 02.02.2025

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# Atmung und CO<sub>2</sub>-Fixierung des Tabaks

Von Peter Waltz

(Aus dem Institut für allgemeine Botanik der Eidg. Technischen Hochschule Zürich)

Eingegangen am 14. Januar 1957

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung . . . . .	55
2. Die Versuchspflanzen . . . . .	57
a) Die Keimlinge . . . . .	57
b) Die Pflanzen . . . . .	57
3. Die nichtflüchtigen organischen Säuren des Tabaks . . . . .	58
4. Die Atmungsmessungen . . . . .	60
a) Methodik . . . . .	60
b) Resultate . . . . .	61
5. Verschiedene Pflanzensubstanzen und ihr Verhältnis zur Atmung . . . . .	65
6. Die CO <sub>2</sub> -Fixierung . . . . .	69
a) Methode . . . . .	70
b) Resultate . . . . .	70
7. Diskussion . . . . .	71
a) Spezieller Teil . . . . .	71
b) Allgemeiner Teil . . . . .	74
8. Zusammenfassung . . . . .	76
9. Literaturverzeichnis . . . . .	76

## 1. Einleitung

Auf Grund umfassender Untersuchungen verschiedener Autoren wurde für viele Vertreter der Succulenten und für einige nichtsucculente Pflanzen ein besonderer Typus der Atmung, die Succulentenatmung, aufgestellt (Bennet-Clark, 1932; Vickery und Pucher, 1940; Thomas, 1949). Alle Pflanzen dieser Gruppe fallen durch einen hohen Gehalt an organischen Säuren auf, von denen Isozitronensäure und Äpfelsäure (Pucher, 1942; Pucher et al., 1947) die größte Rolle spielen.

Schon früh wurde eine starke Schwankung dieser Säuren je nach der Tageszeit erkannt und von verschiedenen Autoren immer wieder bestätigt. Sie führte zur Einführung der Begriffe Acidifikation im Dunkeln und Desacidifikation unter Lichteinfluß.

Parallel zu dieser Schwankung des Totalsäuregehaltes macht sich ein starker Wechsel des Atmungsquotienten ( $RQ = \text{CO}_2 \text{ gebildet} / \text{O}_2 \text{ verbraucht}$ ) geltend, wobei am Tage Werte über eins mit Spitzen von 2,05 (Bennet-Clark, 1932), während der Nacht dagegen solche bis null

und sogar solche unter null mit negativem Vorzeichen erreicht werden (T h o m a s und R a n s o n, 1954).

Von P u c h e r et al. (1948) konnte eine deutliche Abhängigkeit der Säurebildung während der Nacht von der Temperatur nachgewiesen werden (Maximum bei 9° C), und B o n n e r (1948) zeigte den Einfluß der CO<sub>2</sub>-Spannung der Atmosphäre auf die Säurespeicherung. Zunehmende CO<sub>2</sub>-Konzentrationen von 0,0 bis 0,1 % ergeben einen starken linearen Anstieg der Säurebildung bis zu einer Sättigung, so daß größere CO<sub>2</sub>-Mengen keine wesentliche Zunahme mehr bewirken.

Nachdem W o o d und W e r k m a n (1936) die Fixierung von CO<sub>2</sub> und dessen Einbau in organische Säuren durch Propionsäurebakterien nachgewiesen und E v a n s et al. (1943) (siehe auch O c h o a, 1948 a, b; O c h o a et al., 1948 c, d) die allgemeine Verbreitung dieses Vorganges in animalischen Geweben gezeigt hatten, lag es nahe, die Anhäufung von organischen Säuren in Pflanzen vom Succulententypus durch die Wood-Werkman-Reaktion zu erklären.

Es ergibt sich hieraus für die sogenannte Succulentenatmung folgendes vereinfachtes Bild:

Am Tage, bei relativ hohen Temperaturen, werden organische Säuren abgebaut. Dies drückt sich durch einen RQ aus, der über eins liegt. Die CO<sub>2</sub>-Spannung in den Zellen ist niedrig, da das von außen hereindiffundierende sowie das bei der Atmung freiwerdende CO<sub>2</sub> ständig durch die Assimilation eliminiert wird. Das Gleichgewicht Säureaufbau—Säureabbau ist in der Richtung des Abbaues verschoben. Während der Nacht sinkt die Außentemperatur, und die intracelluläre CO<sub>2</sub>-Spannung steigt, da die Assimilation, bei ungefähr gleicher Atmung, wegfällt. Als Ergebnis werden organische Säuren nach der Wood-Werkman-Reaktion aufgebaut.

Im RQ spiegelt sich dieser Vorgang durch Werte unter eins wider. Fällt der RQ unter null, so wird mehr CO<sub>2</sub> fixiert, als die Atmung liefert.

Da der RQ die jeweiligen Änderungen im Säuregehalt genau wiedergibt, kann man annehmen, daß die Sauerstoffaufnahme, die in CO<sub>2</sub>-freier Luft gemessen wird, durch die CO<sub>2</sub>-Fixierung nicht beeinflußt wird oder, anders ausgedrückt, daß Atmung und Fixierung bei Succulenten ohne gegenseitige Beeinflussung vor sich gehen (T h o m a s, 1949).

Ähnlich wie die Succulenten, so ist auch der Tabak reich an organischen Säuren, wobei Äpfelsäure neben Zitronen- und Oxalsäure den größten Anteil ausmacht (P u c h e r et al., 1937, 1941, 1947, 1949). Daneben sind auch die übrigen organischen Säuren des Krebscyclus in kleinen bis kleinsten Mengen sowie die für den Tricarbonsäurecyclus notwendigen Fermentsysteme im Tabakblatt zugegen. (P u c h e r und V i c k e r y, 1941; P a l m e r, 1955; V i c k e r y, 1955.) S c h w a r t z e (1933) (siehe auch V i c k e r y und P u c h e r, 1940) konnte zeigen, daß die im Tabak angehäuften organischen Säuren während des Tages kaum abnehmen und während der Nacht nur unbedeutend aufgebaut werden.

Der RQ liegt für alle in der Schweiz kultivierten Tabaksorten übereins (Eichenberger, 1952; Frey-Wyssling und Waltz, 1955). Es scheint daher im Bereiche der Möglichkeit, daß der Tabak hinsichtlich seiner Atmung dem Succulententypus zuzuzählen ist. Diese Zugehörigkeit zu beweisen oder, falls nötig, einen besonderen Tabaktypus aufzustellen, ist der Zweck der vorliegenden Arbeit.

Die vorliegende Arbeit ist auf Anregung und unter Leitung von Prof. A. Frey-Wyssling am Pflanzenphysiologischen Laboratorium des Institutes für Allgemeine Botanik der ETH durchgeführt worden. Ferner durfte das Isotopenlaboratorium des Institutes für organische Chemie mit freundlicher Genehmigung von Prof. V. Prelog und Dr. H. J. Urech benutzt werden. Bei der Anschaffung von Apparaturen waren die Vereinigten Tabakfabriken AG, Neuchâtel-Serrières, behilflich.

Für die mir zuteil gewordene Hilfe möchte ich meinen Dank aussprechen.

## 2. Die Versuchspflanzen

Für die Versuche wurden Keimlinge und ausgewachsene Pflanzen verwendet. Die Keimlingsversuche wurden stets mit *Nicotiana tabacum* Sorte Paesana, einer im Puschlav (Graubünden) endemischen Form, durchgeführt, da diese einen besonders hohen RQ aufweist. Für Versuche mit ausgewachsenen Pflanzen dienten in den meisten Fällen ebenfalls Paesana, neben *Nicotiana tabacum* Sorte Mt-Calme Jaune, einer hellen, zur Ofentrocknung geeigneten Schweizer Sorte.

Die Samen wurden freundlicherweise von der Forschungs- und Beratungsstelle der SOTA (Société coopérative pour l'achat du tabac indigène) an der Versuchsanstalt Mt-Calme/Lausanne zur Verfügung gestellt.

### a) Die Keimlinge

Die Samen wurden auf straffgespannte, feinmaschige Seidengaze gestreut. Die Gaze lag direkt auf einer gut wassergetränkten Schicht Terralit oder auf Sand. Während der ersten acht Tage wurde mit Leitungswasser, später mit «Lonzinlösung» (2 g/l) gegossen. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 70 bis 80 %, die Temperatur 27 bis 28° C. Für die Versuche wurden die Pflänzchen mit einer Pinzette herausgezogen, wobei Sand bzw. Terralit an der Gaze abgestreift wurde.

### b) Die Pflanzen

Die Zucht der Freilandpflanzen erfolgte nach den in der Schweiz üblichen Methoden.

In den meisten Fällen kamen Gewächshauspflanzen zur Verwendung; sie wuchsen bis zum Setzlingsstadium unter den gewöhnlichen Bedingungen. Die rund 15 cm langen Setzlinge wurden in einem Beet in

Abständen von  $50 \times 60$  cm, bei einer Temperatur von 25 bis 28° C bei Tag und 18 bis 22° C bei Nacht sowie bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65 bis 80 % kultiviert. Die Luft wurde mit Ventilatoren umgewälzt, die auch für eine gleichmäßige Verteilung des als Dampf zugegebenen Wasserdampfes sorgten.

Im Winter erwies sich eine Beleuchtung mit je einer Lampe Osram HWA-500 pro m<sup>2</sup> als notwendig.

Da sich verschieden hoch inserierte Blätter hinsichtlich ihrer Atmung unterscheiden, mußten sie numeriert werden; diese Numerierung der Blätter erfolgt von unten, die Kotyledonen ausschließend (Eichenberger, 1952).

### 3. Die nichtflüchtigen organischen Säuren des Tabaks

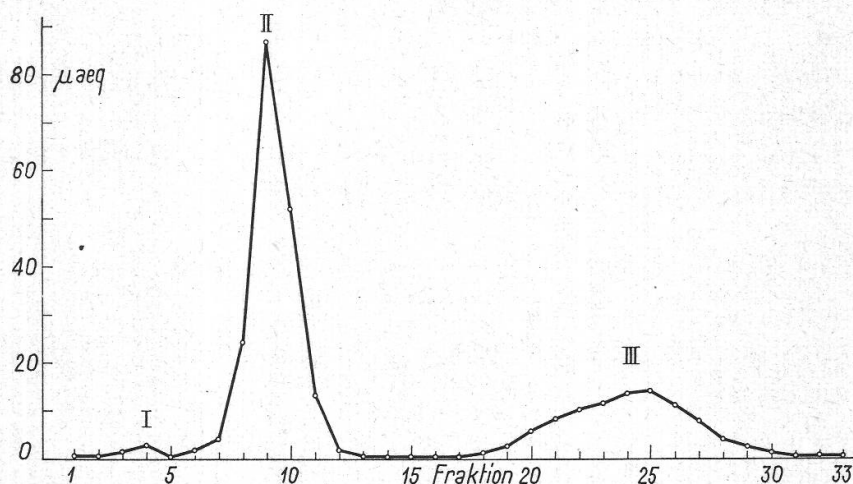
Die Analyse der nichtflüchtigen organischen Säuren, ohne die Oxalsäure, erfolgte nach der von Palmer (1955) beschriebenen Ionenaustauschchromatographie mit Dowex 1-x-8 in Formiatform. Es handelt sich um ein Anionenaustauschharz von mittlerer Porosität und einer Korngröße von 0,037 bis 0,074 mm (200 bis 400 mesh). Die Oxalsäure wurde als Calciumoxalat gefällt und titrimetrisch mit Kaliumpermanganat bestimmt (Palmer, 1955). Die flüchtigen organischen Säuren wurden vernachlässigt, da sie im Tabak nur in sehr kleinen Mengen vorkommen.

Das Pflanzenmaterial wird in einer Porzellanschale mit siedendem Alkohol geworfen und der Alkohol auf dem Wasserbad bei 50° C im Luftstrahl abgedampft. Danach trocknet man bei 65° C während zwölf Stunden im Trockenschrank und zerreibt das Material im Mörser. Die Porzellanschale wird mit Alkohol gewaschen, welcher, auf Volumen gebracht, den resp. Analysen (Kohlehydrate, organische Säuren) prozentual zugegeben wird. Das Tabakpulver wird mit 0,1 ccm 4*n* Schwefelsäure pro 100 mg zerrieben, mit einer doppelten Menge Asbest (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Äther gewaschen) vermischt und während 48 Stunden am Soxhlet mit absolutem Äther extrahiert. Der Äther wird vor der Destillation über CaCl<sub>2</sub> mit Spuren Kaliumpermanganat gewaschen, um organische Beimischungen zu zerstören. Die organischen Säuren werden als Nalze in Wasser aufgenommen und der Äther auf dem Wasserbad bei 35° C im Luftstrahl abgedampft. Das wäßrige Extrakt wird angesäuert, auf Volumen gebracht und filtriert: Extrakte, die nach Palmer alkalisch filtriert werden, verquellen das Dowex, so daß die Eluiersäure nicht durchlaufen kann.

Auf eine 5,5 cm lange Dowexsäule von einer Grundfläche von 0,28 cm<sup>2</sup> wird eine bestimmte Menge des wäßrigen Extraktes gebracht und mit komprimierter Luft mit einer Geschwindigkeit von 1 ccm/min durchgepreßt. Nach Waschen mit dem doppelten Säulenvolumen Wasser, wobei darauf zu achten ist, daß keine Luft eindringt, wird die fertig geladene Säule an die Eluier- und Fraktionier-Apparatur gebracht. Diese besteht aus einer Saugflasche mit Ameisensäure bestimmter Normalität, die durch ein Kapillarrohr mit einer zweiten Saugflasche mit magnetischem Rührer, dem Mischgefäß, verbunden ist. Das Mischgefäß, in dem sich eine bestimmte Menge destilliertes Wasser befindet, ist durch ein Kapillarrohr mit der Chromatographiersäule verbunden. An die erste Saugflasche wird nun Druck angelegt, wodurch die Ameisensäure in das Mischgefäß gelangt, von welchem das homogene, an Ameisensäure ständig sich konzentrierende Gemisch in die Säule fließt. Der Druck wird so

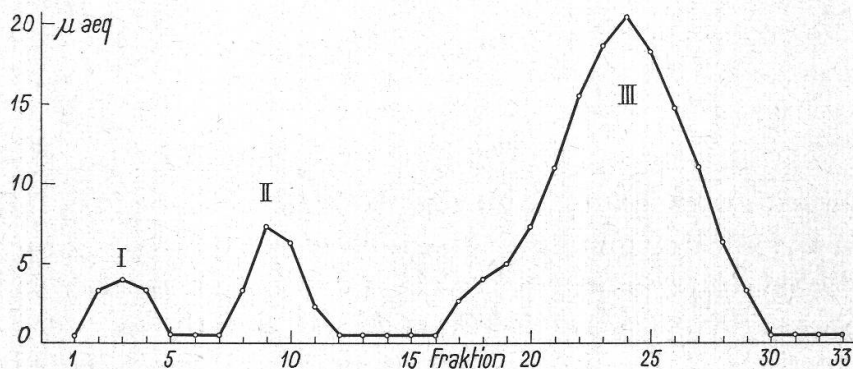
gewählt, daß die Tropfgeschwindigkeit der Säule 1 ccm pro Minute beträgt. Die austropfende Flüssigkeit wird in Reagenzgläsern aufgefangen, welche sich auf einem Fraktionensammler befinden. (Fraktionensammler «Chromatopart» der Firma Bender-Hobein, München). Dieser legt automatisch ein neues Reagenzglas vor, sobald das Vorhergehende auf ein gewünschtes Volumen aufgefüllt ist. Die so erhaltenen Fraktionen werden auf dem Wasserbad bei 46 bis 48° C im Luftstrahl zur Trockene eingedampft, mit 2 ccm CO<sub>2</sub>-freiem Wasser versetzt und auf Phenolrot titriert.

Figur 1 zeigt ein solches Diagramm von nichtflüchtigen organischen Säuren aus Blättern von Paesana, Figur 2 ein solches von Keimlingen der gleichen Varietät.



Figur 1

Ionenaustauschchromatographie von nichtflüchtigen organischen Säuren in  $\mu$  aeq/100 mg Trockengewicht von Blättern von Paesana. Dowex 1-x-8, Formiat. 5,5-cm-Säule. Elution mit zunehmender Konzentration von Ameisensäure, bei 4,2n HCOOH im Reservoir. Tropfgeschwindigkeit 1 ccm/min. 3 ccm/Fraktion.



Figur 2

Nichtflüchtige organische Säuren von Keimlingen von Tabak Sorte Paesana. Daten wie in Figur 1.

Die drei Maxima der beiden Kurven entsprechen sich; das erste gehört einer unbekanntenen Säure an, auf deren Identifizierung wegen der kleinen vorhandenen Mengen nicht eingetreten werden konnte. (Nach der Prüfung mittels Papierchromatographie scheint es sich um Bernsteinsäure zu handeln.) Für quantitative Säurebestimmungen wurde sie als Äpfelsäure gerechnet. Die Zugehörigkeit des zweiten Maximums zur Äpfelsäure konnte durch Modellversuche und Papierchromatographie bewiesen werden. Aus gleichen Gründen kommt das dritte Maximum der Zitronensäure zu. Allerdings sind Zitronensäure und Isozitronensäure nicht unterscheidbar. Ferner ist es nicht ausgeschlossen, daß andere Säuren in kleinen Mengen mit der Zitronensäure eluiert werden (P a l m e r, 1955).

Die Papierchromatographie wurde mit verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt (P a e c h und T r a c y, 1956; R e n t s c h l e r und T a n n e r, 1954). Für Rohextrakte hat sich besonders die Methode von v a n D u r e n (1953) geeignet erwiesen.

#### 4. Die Atmungsmessungen

##### a) Die Methode

Zur Messung des Gasaustausches wurde die direkte Methode von W a r b u r g angewendet (U m b r e i t, B u r r i s und S t a u f f e r, 1945). Der Sauerstoffverbrauch wird in CO<sub>2</sub>-freier Atmosphäre (Absorption des laufend freiwerdenden CO<sub>2</sub> durch 20% KOH) manometrisch gemessen. Anhand dieser Größe wird aus den Druckunterschieden in Kölbchen mit gewöhnlicher Luft das freigewordene CO<sub>2</sub> errechnet.

Die Versuche wurden bei 25 resp. 35° C und einer Schüttelfrequenz von 150—180 Hin- und Herbewegungen pro Minute bei einem Weg von 1,5 cm durchgeführt. Als Aufschlammmedium resp. Feuchthaltemittel wurden 4 ccm resp. 0,5 ccm einer 1/15 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung vom pH 4,5 verwendet (G r o b, 1948; S t e i n m a n n, 1950).

Die Blätter wurden mit Rasierklingen in Streifen von 1×10 mm zerschnitten, unter Beseitigung der Rippen und Seitenrippen. Für die Atmungsmessungen der Keimlinge wurde diese, wenn nicht anders angegeben, ganz, d. h. mit Stengel, Wurzeln, Kotyledonen und eventuellen Blättern verwendet.

Die für die Messungen verwendeten Mengen betragen 200 mg Frischgewicht pro Kölbchen, in Ausnahmefällen jedoch 100 resp. 300 mg.

Das Pflanzenmaterial wurde in den Kölbchen entweder mit 4 ccm Phosphatlösung am Vacuum infiltriert oder auf Filterpapier gelegt und mit 0,5 ccm der Lösung angefeuchtet.

Um zu prüfen, ob die Behandlung der Pflanzenteile, wie Infiltrieren, Zerschneiden und allgemein das Manipulieren, einen wesentlichen Einfluß auf die Atmung habe, wie das A u d u s (1935, 1941) für Kirschlorbeer festgestellt hat, wurden Versuche mit Keimlingen durchgeführt. Und zwar wurden ganze sowie zerschnittene Keimlinge in angefeuchtetem und infiltriertem Zustande hinsichtlich ihrer Atmung vergleichend untersucht. Außerdem wurden intakte Keimlinge auf angefeuchtetem Filterpapier in die Warburgkölbchen gebracht und nach vierundzwanzigstün-

diger Ruhepause unter normalen Bedingungen auf ihre Atmung geprüft (Tabelle 1).

Tabelle 1

Sauerstoffaufnahme in mm<sup>3</sup> pro Stunde und 100 mg Frischgewicht von Keimlingen von Paesana, 14 Tage alt, auf Sand gezogen. I. Pflänzchen zerschnitten und infiltriert. II. Ganz und infiltriert. III. Ganz und auf Filterpapier. IV. Ganz und 24 Stunden in den Kölbchen

	I	II	III	IV
RQ .....	1,25	1,24	1,23	1,32
O <sub>2</sub> -Verbrauch .....	80	92	94	82

Da die Unterschiede klein und unsignifikant sind, kann bei unserem Material von einem bedeutenden Einfluß der Behandlung auf die Atmung keine Rede sein.

### b) Die Resultate

Es sollen hier die Ergebnisse der Versuche über die Atmung verschiedener Pflanzenteile unter verschiedenen Umständen dargelegt werden. Vor allem soll geprüft werden, wie weit der RQ des Tabakes in seinen Abweichungen vom Normalwert und seinen Schwankungen mit dem anomalen RQ der Pflanzen vom Succulententypus übereinstimmt.

In einer ersten Versuchsserie wurden die Schwankungen des RQ während einer Tagesperiode von 24 Stunden bei einer Blattgruppe untersucht. Für einen Versuch wurden je ein Teil mehrerer Blätter verwendet (Figur 3).



Figur 3

Der RQ von sechzehnten Blättern von Mt-Calme-Jaune-Freilandpflanzen, in Abhängigkeit von der Tageszeit. Temperatur am Warburg ist 35° C, die Blattschnitzel sind vacuumfiltriert.



Die gemessenen RQ-Werte sinken nie unter eins. Das um 12 h auftretende Maximum ist stark von der Temperatur im Versuchsfeld abhängig, was in Schwankungen von  $\pm 10\%$  zum Ausdruck kommt.

Da die Schwankung des RQ im Verlaufe eines Tages nicht dem Succulententyp entspricht — es treten nachts keine Werte unter eins auf —, muß geprüft werden, ob eine örtliche Kompensation des RQ, d. h. hohe RQ in gewissen Teilen der Pflanze, tiefe RQ in anderen, vorhanden sei. Es wurden deshalb Versuche an verschiedenen Pflanzenteilen einer Gruppe gleichaltriger und vergleichbarer Pflanzen von Paesana durchgeführt (Tabelle 2).

Tabelle 2

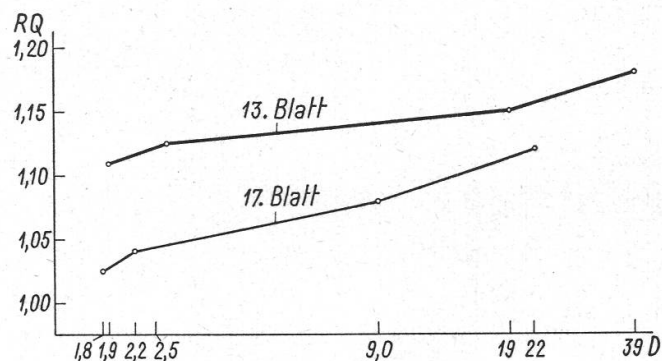
Der RQ verschiedener Pflanzenteile und der ganzen Pflanze. Paesana-Pflanzen mit 18 Blättern. Temperatur am Warburg ist  $35^{\circ}\text{C}$ , die Blattschnitzel sind vacuumfiltriert.

	Blatt	Stengel I. Rinde	Wurzel	Gesamte Pflanze
RQ .....	1,38	1,42	1,07	1,35

Der mittlere RQ der gesamten Pflanze ist anhand der verschiedenen Atmungsintensitäten der Pflanzenteile und ihrer prozentualen Anteile am Trockengewicht errechnet. Bei dem Stengel wurde nur die primäre Rinde berücksichtigt. Die Wurzeln wurden unter lauwarmem Wasser von der anhaftenden Erde befreit und auf Filterpapier getrocknet.

Es zeigt sich, daß auch hier kein RQ unter eins gefunden werden kann.

In einer weiteren Versuchsserie konnte nachgewiesen werden, daß ein Blatt in allen seinen Entwicklungsphasen einen RQ über eins bei-

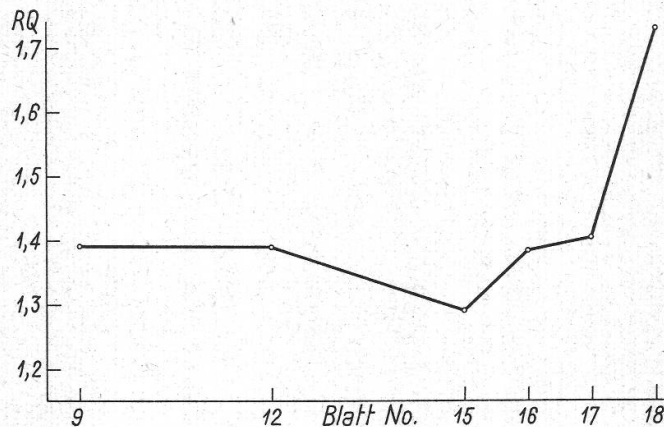


Figur 4

Der RQ von dreizehnten und siebenzehnten Blättern von Mt-Calme Jaune in Abhängigkeit von der Lichtdurchlässigkeit  $D$  eines Alkoholextraktes bei  $434\text{ m}\mu$ . Die Blattschnitzel sind vacuumfiltriert, die Temperatur am Warburg  $35^{\circ}\text{C}$ . Logarithmische Darstellung.

behält. Figur 4. Als Bezugsgröße wurde hier die Lichtdurchlässigkeit eines standardisierten alkoholischen Blattauszuges verwendet, um reife ausgewachsene von unreifen ausgewachsenen Blättern zu unterscheiden.

Auch in bezug auf die Insertionshöhe der Blätter ergibt sich stets ein RQ über eins. Die untersuchten Pflanzen hatten 18 Blätter, wobei das zwölfte, größte eine Länge von 34 bis 35 cm, das letzte, achtzehnte eine solche von 1,0 bis 1,5 cm aufwies. Figur 5. Interessant ist der sehr hohe Wert der kleinsten Blätter. Dem tieferen Wert des fünfzehnten Blattes kommt kaum eine besondere Bedeutung zu.

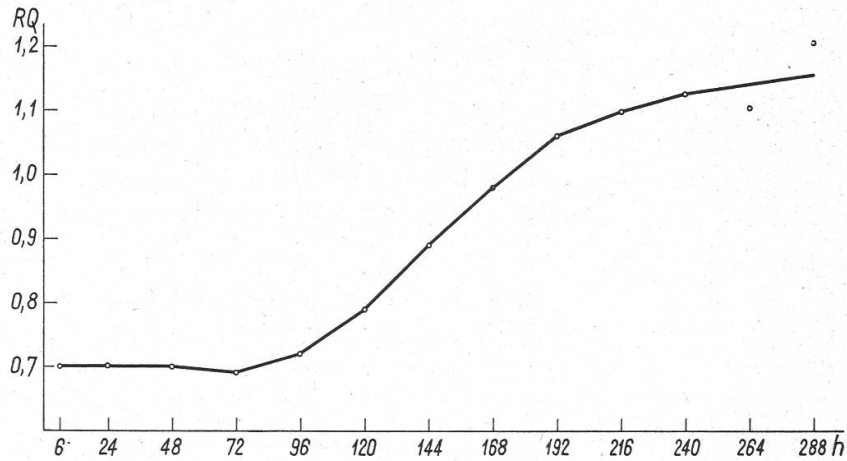


Figur 5

Der RQ in Abhängigkeit von der Insertionshöhe der Blätter von Mt-Calme Jaune. Temperatur am Warburg 35° C, die Blätter sind vacuumfiltriert.

Eine interessante Möglichkeit bieten Keimlinge, da bei ihnen eine Fettatmung mit einem RQ unter eins so lange zu erwarten ist, als der Keimling gänzlich oder teilweise von seinen Fettreserven lebt. Dieser niedere RQ sowie der graduelle Übergang zur Normalatmung, die sich durch ihre RQ über eins deutlich zu erkennen gibt, lassen sich einwandfrei messen (Figur 6).

Nimmt man an, daß der hohe RQ von Tabak, gleich wie bei Succulenten, durch den Abbau von organischen Säuren entsteht, so ist zu erwarten, daß bei Atmungsmessungen, die sich über längere Zeit erstrecken, der RQ unter eins sinkt, wenn der Vorrat an zugänglichen organischen Säuren erschöpft ist. Es wurden deshalb Versuche durchgeführt, bei denen die Atmung über längere Zeit verfolgt wurde. Dabei sank der RQ nach einer für die Sorte und das Material typischen Zeit unter eins. Figur 7 stellt eine solche Kurve für Blätter von Paesana dar. Auffallend sind die anfänglich sehr hohen RQ-Werte. Da diese in Versuchen, bei denen der Tabak nicht vacuumfiltriert ist, sondern auf feuchtem Filterpapier liegt, nicht auftreten, kann wohl angenommen werden, daß die hohen Werte durch eine ungenügende Sauerstoffzufuhr bedingt sind.



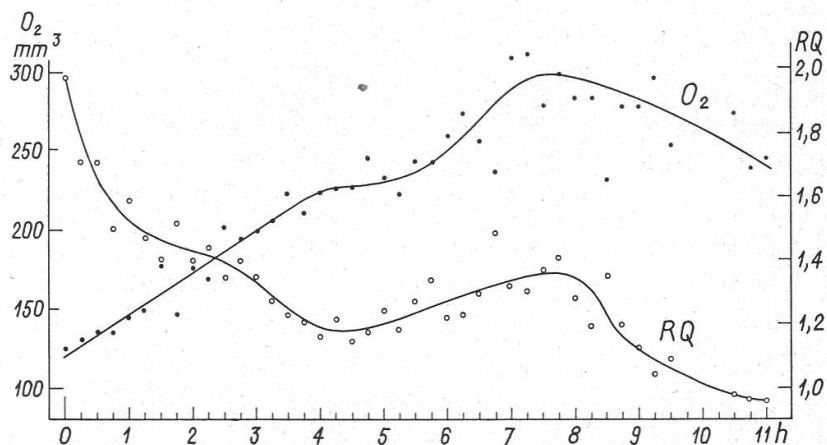
Figur 6

Der RQ von keimenden Tabaksamen von Paesana in Abhängigkeit von der Keimzeit in Stunden nach dem Aussäen. Keimung auf Terralit. Temperatur am Warburg ist  $35^{\circ}\text{C}$ , die Pflanzen sind vacuuminfiltriert.

Diese mangelhafte Sauerstoffzufuhr spielt nur bei den ersten Messungen eine Rolle. Bei Mittelwerten aus Messungen während mehrerer Stunden fallen diese hohen Werte kaum ins Gewicht (vgl. Tabelle 1).

In Figur 8, einer RQ-Kurve von Paesana-Keimlingen bei lange andauernder Atmungsmessung, treten keine hohen Anfangswerte auf; die Keimlinge liegen auf feuchtem Filterpapier. In andern Fällen wurden noch flachere Kurven gefunden.

Nach den ersten Werten fällt die RQ-Kurve in Figur 7 stark ab, um nach einem erneuten Anstieg unter eins zu sinken. Mont-Calme Jaune ergibt einen ähnlichen Kurvenlauf, wobei allerdings die Mittelwerte des RQ näher bei eins liegen und der RQ auch früher unter eins sinkt.

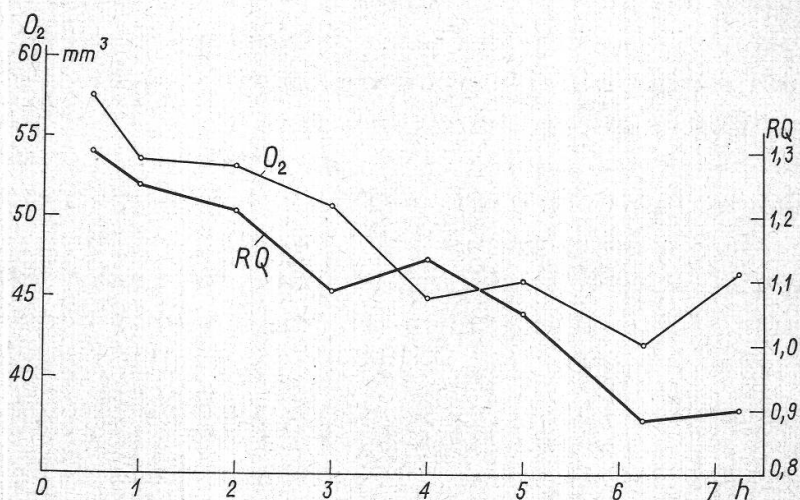


Figur 7

RQ und Sauerstoffaufnahme in  $\text{mm}^3$  pro 200 mg Frischgewicht und  $\frac{1}{4}$  Stunde von zwölften Blättern von Paesana.  $35^{\circ}\text{C}$  am Warburg. Vacuuminfiltriert.

Auf die Bedeutung dieser Kurven (Figuren 7 und 8) soll im Zusammenhang mit der Analyse der organischen Säuren noch zurückgekommen werden.

Der Kurvenverlauf der Sauerstoffaufnahme sowie die Streuung des RQ und der Sauerstoffaufnahme sind stark temperaturabhängig. Die Streuung nimmt allgemein mit niederen Temperaturen zu.



Figur 8

RQ und Sauerstoffaufnahme in mm<sup>3</sup> pro 200 mg Frischgewicht und 1/4 Stunde von Paesana-Keimlingen bei einer Temperatur von 25° C am Warburg. Die Keimlinge liegen auf feuchtem Filterpapier.

## 5. Verschiedene Pflanzensubstanzen und ihr Verhältnis zur Atmung

Zur Erklärung des Absinkens des RQ unter eins nach langer Versuchsdauer, wie das in den Figuren 7 und 8 dargestellt ist, wurden Versuche in 150-cm<sup>3</sup>-Erlenmeyern mit dreiunddreißigsten Blättern von Paesana durchgeführt. Am Anfang der Versuche sowie nach 2 resp. 10 Stunden wurden Proben entnommen und nach vorstehender Methode auf ihren Säuregehalt untersucht. Die Resultate sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3

Nichtflüchtige organische Säuren in  $\mu\text{aeq}/100$  mg Trockengewicht von dreiunddreißigsten Blättern von Paesana. Ionenaustauschchromatographie. Blattmaterial vacuum-infiltriert in 150-ccm-Erlenmeyern.

	0 h	2 h	10 h	$\Delta$ 0 h/10 h
Äpfelsäure.....	100	112	107	+ 7
Zitronensäure.....	56	155	192	+ 136
Oxalsäure.....	31	9	10	- 21

Da die Zitronensäure bei einer annähernd gleich bleibenden Menge Äpfelsäure im Verlaufe der 10 Stunden zunimmt, wird die Möglichkeit, das Absinken des RQ unter eins durch ein Verschwinden der organischen Säuren zu erklären, vereitelt. Die starke Abnahme der Oxalsäure in der ersten Periode erlaubt eine Erklärung der relativ hohen RQ-Werte (Figur 7 am Anfang des Versuches, unter Berücksichtigung der anfänglichen Erhöhung des RQ durch mangelhafte Sauerstoffzufuhr).

Da die obigen Versuche in Erlenmeyern und nicht in Warburgkölbchen durchgeführt wurden, schien es angebracht, die beiden Methoden durch Parallelanalysen zu vergleichen. Der Versuch (Tabelle 3) wurde deshalb wiederholt und gleichzeitig ein analoger Versuch in Warburgkölbchen durchgeführt. Um beim Warburg-Versuch genügend Material für die Analyse der organischen Säuren zu erhalten, wurde das Pflanzenmaterial mehrerer direkt aufeinanderfolgender Atmungsversuche nach dem Abtöten in siedendem Alkohol gesammelt und zusammen aufgearbeitet. Die Resultate sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4

Die nichtflüchtigen organischen Säuren in  $\mu\text{aeq}/100$  mg Trockengewicht von dreiunddreißigsten und vierunddreißigsten Blättern von Paesana in Erlenmeyern (E) und Warburgkölbchen (W) nach eineinhalbstündiger Versuchsdauer. Vacuumfiltriert.

	0 h	$1\frac{1}{2}$ h E	$1\frac{1}{2}$ h W	$\Delta$ 0/E	$\Delta$ 0/W
Äpfelsäure .....	132	124	148	— 8	+ 16
Zitronensäure.....	67	115	64	+ 48	— 3
Oxalsäure .....	44	33	—	— 11	—

Es zeigt sich, daß die Veränderungen der organischen Säuren nach der gewählten Versuchszeit bei Erlenmeyer- und Warburgkölbchen nicht übereinstimmen. Vielmehr verhalten sich Äpfel- und Zitronensäure in den beiden Kölbchentypen invers; außerdem fällt die Totalzunahme der Säuren verschieden groß aus.

Während bei dem in Tabelle 4 dargestellten Versuche das Blattmaterial in den Erlenmeyerkolben von gewöhnlicher Luft umgeben ist, verhält sich die Atmosphäre in den Warburgkölbchen verschieden. Da bei diesem Versuche die Atmung, d. h. der RQ, gemessen wurde, befindet sich in der einen Hälfte der Kölbchen eine  $\text{CO}_2$ -freie Atmosphäre (Sauerstoffmessung), während in der anderen Hälfte gewöhnliche Luft vorliegt. Für die Analyse der organischen Säuren des am Warburg gemessenen Materials wurden nachträglich die Blattschnitzel aus den mit  $\text{CO}_2$ -freier und den mit normaler Luft gefüllten Warburgkölbchen vereinigt.

Da der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck den maßgebenden Unterschied zwischen Erlenmeyer- und Warburgkölbchen bildet und durch die Vereinigung des

Blattmaterials aus den beiden Typen Warburgkölbchen ein unklares Bild entsteht, wurden weitere Versuche durchgeführt.

Aus den Angaben der Tabellen 3 und 4 muß geschlossen werden, daß die organischen Säuren für den hohen RQ nicht allein verantwortlich sein können. Deshalb soll in dem folgenden Versuche auch die Änderung des Nitrates während der Versuchszeit berücksichtigt werden, da eine Reduktion relativ kleiner Nitratmengen bereits einen namhaften Einfluß auf den RQ ausüben kann.

#### *Methode der Nitratanalyse*

Das Nitrat wird kolorimetrisch als 2,2,4-Trinitrophenoldisulfonsäure bestimmt (P a e c h und T r a c y, 1956).

Das Analysenmaterial wird drei Stunden bei 103° C im Thermostaten getrocknet und darauf im Mörser pulverisiert. Durch Übergießen mit Silbersulfat werden das störende Chlor und mit Kupfersulfat die organischen Substanzen gefällt.

Danach wird die Farbreaktion mit Phenoldisulfonsäure und conc. Ammoniak ausgeführt. Die Extinktion wird im Pulvrich-Photometer bei 434 m $\mu$  gemessen.

Um den Abbau der organischen Säuren und der Nitratreduktion in ihrer Auswirkung auf den RQ auswerten zu können, müssen quantitative Analysen der Kohlehydrate, die das Grundsubstrat der Atmung darstellen, durchgeführt werden.

#### *Methode der Analyse der Kohlehydrate*

Die Bestimmung der Stärke erfolgt kolorimetrisch mit Anthron (M c C r e a d y et al., 1950). Die Stärke wird mit HClO<sub>4</sub> hydrolysiert und die Farbreaktion an der Glukose ausgeführt. Die Messung der Extinktion wird im Pulvrich-Photometer bei 619 m $\mu$  vorgenommen.

Die reduzierenden Substanzen werden mit Alkohol extrahiert, und nach Reinigung mit Aktivkohle nach S o m o g y i - N e l s o n (1945, 1944) kolorimetrisch bestimmt. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 494 m $\mu$ .

Die nichtreduzierenden werden zusammen mit den reduzierenden Zuckern extrahiert, mit Invertase invertiert und gemeinsam kolorimetrisch bestimmt. Durch Subtraktion der Werte für reduzierende Substanzen erhält man die Mengen nichtreduzierender Zucker.

In Tabelle 5 sind die Resultate dieser Versuche wiedergegeben. Die Atmung von Blattschnitzeln auf feuchtem Filterpapier wurde gemessen. Zehn parallele Versuche ergaben genug Material für die Analysen, während das Material für die Nitratanalysen zwei Atmungsversuchen entnommen wurde. Die Blattschnitzel der Kölbchen mit CO<sub>2</sub>-freier resp. gewöhnlicher Luft wurden separat gesammelt und aufgearbeitet.

Die mit 0 Stunden bezeichnete Entnahme bezieht sich auf den Beginn, die mit 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stunden auf das Ende der Atmungsmessung, deren Resultate in Tabelle 6 zusammengestellt sind.

Es zeigt sich in Tabelle 5 deutlich, daß die Anwesenheit des CO<sub>2</sub> für den Unterschied zwischen Erlenmeyern (ohne KOH) und Warburgkölb-

chen (mit KOH) die maßgebende Rolle spielt. Ferner scheint der Nitratreduktion bei ausgewachsenen Blättern keine Bedeutung zuzukommen. Der Zusammenhang der Veränderungen der organischen Säuren während der Versuchsdauer und des RQ soll später diskutiert werden.

Tabelle 5

Die organischen Säuren in  $\mu\text{aeq}/100$  mg Trockengewicht, die Kohlehydrate und das Nitrat in mg/100 mg Trockengewicht. Zweiundzwanzigste und dreiundzwanzigste Blätter von Paesana. Auf Filterpapier in Warburgkölbcchen. Versuchsdauer eineinhalb Stunden.

	0 h	1 $\frac{1}{2}$ h ohne KOH	1 $\frac{1}{2}$ h mit KOH	$\Delta$ 0/ohne KOH	$\Delta$ 0/mit KOH
Äpfelsäure .....	187	207	168	+ 20	- 19
Zitronensäure.....	99	99	72	0	- 27
Oxalsäure .....	48,1	41,7	39,8	- 6,4	- 8,3
Red. Zucker .....	0,15	0,25	0,17	+ 0,10	+ 0,02
Inv. Zucker .....	0,97	0,50	0,28	- 0,47	- 0,69
Stärke .....	8,91	6,41	5,95	- 2,50	- 3,96
NO $_3^-$ 1.....	0,54	0,57	0,56	+ 0,03	+ 0,02

Tabelle 6

Der RQ, der totale Sauerstoffverbrauch resp. die Kohlendioxydproduktion in mm $^3$  pro 100 mg Trockengewicht in eineinhalb Stunden. Reduziert auf Normaldruck. Siehe Tabelle 5

Sauerstoffverbrauch	Kohlendioxyd- produktion	RQ
3050	3490	1,15

Da bekannt ist, daß junge Pflanzen einen regeren Nitratstoffwechsel aufweisen, wurden Untersuchungen an 17 bis 19 Tage alten Keimlingen von Paesana durchgeführt. Die Versuchsbedingungen der in Tabellen 7 und 8 dargestellten Resultate sind gleich wie die der Tabellen 5 und 6. Das zur Analyse gelangende Material stammt von 12 parallelen Atmungs-messungen, die Analysen sind Mittel zweier Bestimmungen.

Es macht sich ein deutlicher Einfluß des CO $_2$  auf die Mengen verbrauchter resp. gebildeter organischer Säuren sowie auf die anderen untersuchten Substanzen geltend. Während die allgemeine Charakteristik dieses Versuches mit jener von Tabellen 5 und 6 sehr gut übereinstimmt, zeigt sich im Nitrat ein wesentlicher Unterschied. Es sind größere Mengen vorhanden, und die Umsätze sind bedeutender. Diese beiden Fak-

<sup>1</sup> Diese leichte Zunahme steht im Widerspruch zu den zuverlässigen Analysen von M u n s c h e (1955). Da jedoch die Unterschiede sehr klein sind, darf man annehmen, daß das Nitrat unverändert bleibt.

toren sind stark vom Alter der Keimlinge abhängig, worüber Tabelle 9 Aufschluß gibt.

Tabelle 7

Die organischen Säuren in  $\mu\text{aeq}/100$  mg Trockengewicht, die Kohlehydrate und das Nitrat in mg/100 mg Trockengewicht von Paesana-Keimlingen auf feuchtem Filterpapier bei einer Versuchsdauer von eineinhalb Stunden.

	0 h	1 $\frac{1}{2}$ h ohne KOH	1 $\frac{1}{2}$ h mit KOH	$\Delta$ 0/ohne KOH	$\Delta$ 0/mit KOH
Äpfelsäure .....	32,7	26,5	41,8	— 6,2	+ 9,1
Zitronensäure.....	127	129	109	+ 2,0	— 18,0
Oxalsäure .....	21,6	18,4	22,8	— 3,2	+ 1,2
Red. Zucker .....	0,71	0,56	0,39	— 0,15	— 0,32
Inv. Zucker .....	0,50	0,42	0,47	— 0,08	— 0,03
Stärke .....	7,15	6,60	6,55	— 0,55	— 0,60
NO $_3^-$ .....	4,75	4,65	4,49	— 0,10	— 0,26

Tabelle 8

Der RQ, der totale Sauerstoffverbrauch und die CO $_2$ -Produktion in mm $^3$  pro 100 mg Trockengewicht in eineinhalb Stunden von Paesana-Keimlingen. Vgl. Tabelle 7.

O $_2$	CO $_2$	RQ
4350	4950	1,14

Tabelle 9

Nitratmengen in Abhängigkeit vom Alter der Keimlinge von Paesana, ausgedrückt durch die Länge der ersten Blätter in mm. Nitrat in mg/100 mg Trockengewicht, nach eineinhalb Stunden im Warburg

	0,5–1,0	1,0–1,5	1,5–3,0
NO $_3^-$ .....	1,3	0,5	0,2

Die Werte in Tabelle 9 sind Mittel aus den Kölbchen mit CO $_2$ -freier und gewöhnlicher Luft.

## 6. Die CO $_2$ -Fixierung

Auf Grund der großen Rolle, die das CO $_2$  der Luft beim Stoffwechsel des Tabaks im Dunkeln zu spielen scheint, lag die Annahme einer CO $_2$ -Dunkelfixierung nahe. Es wurden deshalb Versuche mit C $^{14}$ O $_2$  durchgeführt, bei denen die Versuchsbedingungen jenen der bisherigen Versuche angeglichen wurden.



### a) Methodik

Ein Gefäß mit einem den Warburgkölbchen möglichst ähnlichen Grundflächen/Volumen-Verhältnis ist oben durch einen Schliff verschlossen. Durch den Schliff stoßen drei Glasröhren, von denen die beiden äußeren durch verschließbare Gummiverbindungen das Spülen der Atmosphäre erlauben, während unter dem mittleren Glasrohr ein kleines Glasgefäß aufgehängt ist.

Das Pflanzenmaterial wird auf Filterpapier in den Kolben gebracht und mit  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1/15 M befeuchtet. Das  $\text{BaC}^{14}\text{O}_3$  befindet sich in dem kleinen Glasgefäß. Durch das darüber befindliche Glasrohr wird nun eine Pipette eingeführt und 20% Perchlorsäure im Überschuß zugegeben. Danach wird das Glasrohr schnell verschlossen.

Der Kolben wird nun bei 25° C im Dunkeln auf eine Schüttelmaschine gestellt.

Nach beendetem Versuch wird auf gewohnte Weise mit siedendem Alkohol abgetötet und zum wäßrigen Extrakt aufgearbeitet. Dieser wird nun an einer Dowexsäule gereinigt (Elution mit 7n Ameisensäure). Das alle organischen Säuren enthaltende Eluat wird eingedampft und titriert. Nun werden die Säuren nach dem normalen Ionenaustauschverfahren getrennt und bestimmt. Die respektiven Fraktionen werden vereinigt, die Säuren durch Ionenaustausch freigesetzt und am Geigerzähler gemessen. (The 100-Scaler, Tracerlab Inc., Boston.)

Die Oxalsäure wird aus dem wäßrigen Extrakt als Calciumoxalat ausgefällt, zentrifugiert, gewaschen, in 2n Schwefelsäure gelöst, am Kutscher-Stüdel 48 Stunden mit Äther extrahiert und schließlich zur Trockene eingedampft. Die freie Oxalsäure wird am Geigerzähler auf ihre Aktivität geprüft.

### b) Resultate

In einem ersten Versuch wurden dreizehnte Blätter von Paesana verwendet. Die Äpfel- und die Zitronensäurefraktionen erwiesen sich als radioaktiv. Die Äpfelsäure wurde mit einer dreißigfachen Menge inaktiver Säure vermischt und aus Aceton Benzol umkristallisiert, worauf sich die Aktivität in der reinen Säure fand (B u h l e r et al., 1956).

In einem zweiten Versuch wurden die relativen Aktivitäten der verschiedenen Säuren bestimmt. Es wurde das vierzehnte Blatt von Paesana verwendet. Die spezifische Aktivität des  $\text{BaC}^{14}\text{O}_3$  ist 1 mc/millimol. Die Aktivitäten sind in cpm (counts per minute) pro Milliäquivalent angegeben.

Tabelle 10

Relative Aktivitäten der verschiedenen nichtflüchtigen organischen Säuren von vierzehnten Blättern von Paesana nach eineinhalb Stunden Versuchsdauer und 0,2 mc  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  (3,2 mg Bariumcarbonat) in der Atmosphäre. Im Dunkel bei 25° C.

	cpm/milliaeq.	$\mu\text{aeq}/100$ mg Trockengewicht
Äpfelsäure.....	$17,4 \cdot 10^4$	109
Zitronensäure.....	$9,4 \cdot 10^4$	101
Unb. Säure.....	$0,5 \cdot 10^4$	4
Oxalsäure.....	—	50

Wie zu erwarten war, zeigt Äpfelsäure die größte Aktivität, während Oxalsäure keine aufweist. Die Aktivitäten der Zitronensäure und der

unbekannten Säure deuten auf einen raschen Umbau der Säuren unter sich, wobei interessanterweise die in kleinen Mengen auftretende unbekannte Säure recht aktiv im Stoffwechsel zu sein scheint.

Die angegebenen Aktivitäten sind keine absoluten, sondern nur untereinander vergleichbare relative Werte. (Absolute Werte erhält man größenordnungsmäßig durch Multiplikation mit  $10^2$ .) Immerhin darf man aus den Zahlen auf eine ziemliche Intensität der  $\text{CO}_2$ -Fixierung schließen, zumal das  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  durch das bei der Atmung anfallende  $\text{CO}_2$  stetig verdünnt wird.

## 7. Diskussion

### a) Spezieller Teil

Wie gezeigt werden konnte, übt die Behandlung des Pflanzenmaterials (Zerschneiden, Infiltrieren usw.) vor und während der Messungen keinen wesentlichen Einfluß auf die Atmung aus. Daraus geht hervor, daß die von A u d u s mit Kirschchlorbeerblättern erhaltenen Ergebnisse für Tabak nicht oder nur in untergeordnetem Maße zutreffen.

Eine Ausnahme macht die mangelhafte Sauerstoffzufuhr zu Beginn der Experimente mit am Vacuum infiltriertem Material, wodurch eine Erhöhung des RQ entsteht. Eine Beeinflussung der Atmung durch den Phosphatpuffer ist möglich (U l r i c h , 1941; H a n d l e y and O v e r s t r e e t , 1955), jedoch kaum von großer Bedeutung.

Unter normalen Bedingungen kann für keines der untersuchten Tabakgewebe ein RQ unter eins nachgewiesen werden. Diese Resultate deuten auf einen wesentlichen Unterschied gegenüber dem Gaswechsel der Succulenten hin. Es wurde ferner gezeigt, daß kein Ausgleich des RQ innerhalb der Pflanze — Abbau der Kohlehydrate zu Säuren in bestimmten Geweben, Abbau der Säuren in anderen — stattfindet.

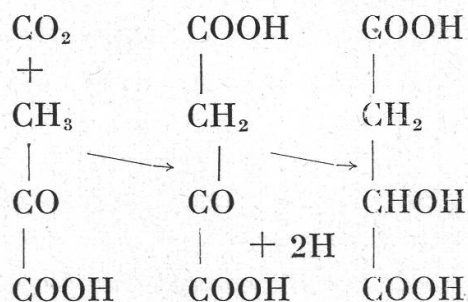
Nur die Wurzeln und die jüngsten Blätter zeigen eine wesentliche Abweichung von dem sonst sehr konstanten RQ des Tabaks. In den Wurzeln — tiefer RQ — werden wohl wenig Säuren veratmet, was eventuell mit einer fehlenden Kohlendioxydfixierung in Zusammenhang steht. Der besonders hohe RQ der jüngsten Blätter ist wahrscheinlich durch eine Zufuhr von organischen Säuren aus anderen Pflanzenteilen bedingt.

Aus Versuchen mit Keimlingen geht hervor, daß die ganzen Pflanzen mit zunehmendem Alter von der reinen Fettatmung der Ölsamen stufenlos zur Normalatmung übergehen, wie wir sie für ausgewachsene Pflanzen festgestellt haben.

Mit Hilfe von  $\text{C}^{14}\text{O}_2$  konnte eine Kohlendioxyd-Fixierung durch die Blätter des Tabaks im Dunkeln nachgewiesen werden; das Kohlendioxyd findet sich zum größten Teil in der Äpfelsäure, zum kleineren in der Zitronensäure und der unbekannten Säure (wahrscheinlich Bernstein-

säure) wieder. Es sind zwei Vorgänge bekannt, nach denen CO<sub>2</sub> im Dunkeln aufgenommen wird.

Der eine (W o o d und W e r k m a n , 1936, 1940) führt von Brenztraubensäure über Oxalessigsäure zur Äpfelsäure.



Es werden dazu Mn-Ionen benötigt. Als Ferment ist das Malatenzym mit TPN (Triphosphopyridinnucleotid) als Coenzym wirksam (O c h o a et al., 1948 a).

Daneben besteht der von O c h o a (1948 a, b) (siehe auch O c h o a et al., 1948 b) gezeigte Weg von der  $\alpha$ -keto-Glutarsäure über Oxalbernsteinsäure zur Isozitrone Säure, wobei neben Isozitrone Säuredehydrogenase, Oxalbernsteinsäurecarboxylase und Aconitase ebenfalls Mn-ionen und TPN notwendig sind. Ferner ist Glukose-6-Phosphat zur Reduktion des TPN zu H<sub>2</sub>TPN unerläßlich.

Die Zwischenstufen beider Vorgänge — Oxalessigsäure und Oxalbernsteinsäure, besonders letztere ist sehr instabil — werden durch die von uns verwendeten Analysenmethoden nicht erfaßt. Auch kann Isozitrone Säure von Zitronensäure nicht unterschieden werden.

Da nun aber die Äpfelsäure die größte Radioaktivität aufweist und die andern organischen Säuren sich mit ihr im Gleichgewicht befinden, scheint die Annahme der Carboxylierung nach W o o d - W e r k m a n wahrscheinlich. Da in jedem Gleichgewichtszustand eine fortlaufende Interkonversion der beteiligten Substanzen besteht, ergibt sich ohne weiteres eine Erklärung für die Aktivitäten der Zitronensäure und der unbekannteren Säure.

Für die Warburg-Versuche liegt auf Grund der festgestellten Kohlendioxydfixierung folgende Situation vor: In den Kölbchen mit CO<sub>2</sub>-freier Luft wird der Sauerstoffverbrauch gemessen, in den Kölbchen mit gewöhnlicher Luft dagegen Druckveränderungen durch das Zusammenspiel von Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxydbildung. Aus ihnen läßt sich die Menge des freigesetzten Kohlendioxyds durch Abzug der Sauerstoffwerte errechnen.

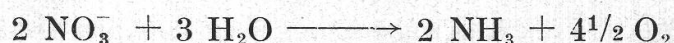
Nur unter der Annahme, daß der Sauerstoffverbrauch durch die Kohlendioxydfixierung nicht wesentlich verändert wird, können wir die gefundenen RQ-Werte als richtig betrachten. Findet jedoch eine Beeinflussung des Sauerstoffverbrauches statt, so sind die von uns gemessenen

RQ-Werte entweder zu hoch oder zu tief, je nach der Richtung der Beeinflussung. Da wir aber keine Anhaltspunkte über die Art einer solchen Beeinflussung besitzen und auch mit den uns zur Verfügung stehenden Untersuchungsmitteln keine Möglichkeit zur Abklärung dieser Verhältnisse besteht, wird in dieser Diskussion der Ergebnisse das Gewicht weniger auf die absoluten Werte als vielmehr auf den Verlauf des Gaswechsels in Funktion der geprüften Variablen gelegt werden.

Von besonderem Interesse ist die Kurve des RQ bei langer Versuchsdauer (Figur 7). Sie zeigt, wie bereits erwähnt, einen sehr starken Abfall in der ersten, kurzen Zeitspanne, worauf ihr Verlauf sich anschließend verflacht. (Ein endogener Rhythmus kommt nicht in Frage, da Versuche, die zu verschiedenen Zeitpunkten begonnen wurden, stets gleiche Kurvenbilder ergeben ([Brown et al., 1955].) Wie wahrscheinlich gemacht werden konnte, ist der erste Abfall auf eine mangelhafte Sauerstoffzufuhr zurückzuführen. Der weitere, flachere Abfall ergibt sich aus dem Abbau der Oxalsäure (Tabellen 3 und 5), welche durch ihren hohen RQ von 4,0 die Atmung selbst bei sehr kleinen Umsätzen wesentlich beeinflusst (Beträchtigung der Atmungsintensität). Anschließend schwankt die Kurve um einen Mittelwert, den man als Normalniveau betrachten kann. Die auftretenden Abweichungen werden durch den Abbau und Aufbau von Säuren sowie verschieden starke Atmungsintensitäten (Figur 8) verursacht. In Tabelle 3, einem Versuch, der die Verhältnisse unter Anwesenheit von CO<sub>2</sub> wiedergibt, zeigt sich ein leichter Anstieg der Äpfelsäure und ein starkes Ansteigen der Zitronensäure. Die Steigung der Säurekurven ist jedoch inkonstant. Das endgültige Absinken des RQ unter eins scheint hauptsächlich auf eine Verminderung der Atmung bei gleichbleibender Kohlendioxydfixierung zurückzuführen zu sein. Die Kurve des Sauerstoffverbrauches sinkt hier nämlich stark ab.

Für Keimlinge ergibt sich ein in großen Zügen ähnliches, in Einzelheiten jedoch verschiedenes Bild. So ist die RQ-Kurve flacher und fällt auch schneller auf Werte unter eins ab. Die Säureumsätze sind kleiner als bei Blättern, wobei nach Ende der eineinhalbstündigen Versuchszeit eine Abnahme der Totalsäuren zu verzeichnen ist. Die Nitratmengen liegen wesentlich über jenen für Blätter, und ihre Verminderung während der Versuchszeit ist deutlich.

Hieraus läßt sich schließen, daß die Kohlendioxydfixierung bei den Keimlingen wahrscheinlich eine kleinere Rolle spielt als bei den Blättern. Das RQ-Niveau wird einerseits durch Säureabbau, andererseits durch die Nitratreduktion gehalten, welche auch bei kleinem Umsatz einen wesentlichen Einfluß auf den RQ ausübt, da beträchtliche Mengen O<sub>2</sub> freigesetzt werden.



In ausgewachsenen Blättern spielt die Nitratreduktion dagegen keine ins Gewicht fallende Rolle (vgl. Tabelle 5).

Bei allen Versuchen ohne KOH nimmt die Kohlendioxydspannung in den Reaktionsgefäßen ständig zu, und zwar nach eineinhalbstündiger Versuchsdauer in den gemischten Kölbchen von 0,03 ‰ auf zirka 4 ‰. Diese CO<sub>2</sub>-Werte sind natürlich stark vom Material und von seiner Atmungsintensität abhängig.

### b) Allgemeiner Teil

Von besonderem Interesse sind natürlich die verschiedenen Ab- und Umbauvorgänge, die unter unseren Versuchsbedingungen im Gewebe gleichzeitig vor sich gehen. Diese sind:

- a) Abbau der Stärke zu reduzierenden und nichtreduzierenden Zuckern;
- b) Abbau der Zucker via Krebscyclus zu Kohlendioxyd und Wasser unter Sauerstoffaufnahme;
- c) Abbau von organischen Säuren, die dem Krebscyclus angehören, d. h. Äpfel- und Zitronensäure;
- d) Abbau der Oxalsäure;
- e) Aufbau von Säuren des Krebscyclus durch Fixierung von CO<sub>2</sub> im Dunkeln, wobei Äpfelsäure neben Zitronensäure und einer unbekannteren Säure die Hauptrolle spielt;
- f) Reduktion von Nitrat bei Keimlingen.

Zu b). Die Bedeutung des Krebscyclus wurde von vielen Autoren gezeigt. So konnten die meisten der darin vorkommenden Säuren sowie auch die für die Vorgänge notwendigen Fermente in verschiedenen höheren Pflanzen und großenteils auch im Tabak nachgewiesen werden. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß die Kohlehydrate via Krebscyclus abgebaut werden.

Zu c). Im Verhältnis zu den vorhandenen Säuremengen sind die Umsätze, Verlust wie auch Zunahme, relativ klein. Während ein Verlust an Säuren weitgehend durch einen Abbau erklärbar ist, bleiben für eine Zunahme die Möglichkeiten einer zögernden Fermentaktivität des Abbau-systems oder eine Kohlendioxydfixierung im Dunkeln offen. Bei den Keimlingen, mit dem Verschwinden von relativ großen Nitratmengen, darf angenommen werden, daß ein Teil der organischen Säuren durch Aminierungen in Aminosäuren übergeführt werden.

Die relative Konstanz der in den Geweben vorhandenen Säuremengen könnte eventuell mit der Bedeutung der organischen Säuren als Regulatoren des Redoxpotentials in Zusammenhang stehen (W a r t e n b e r g und R u m m e n i , 1952; R u m m e n i , 1953, 1954). Ferner ist es wahrscheinlich, daß gewisse Mengen der organischen Säuren durch Bindung

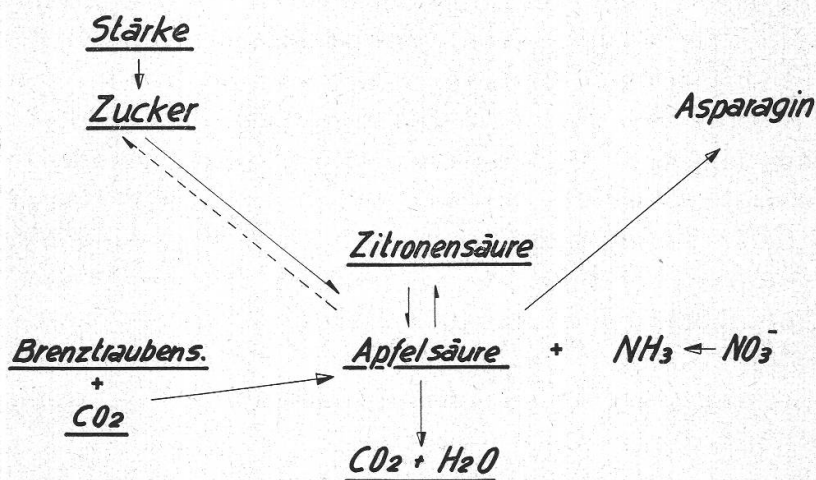
an andere Substanzen, wie zum Beispiel Nicotin, oder auch zur Aufrechterhaltung des Kationen-Anionen-Gleichgewichtes dem unmittelbaren Stoffwechsel entzogen werden.

Zu d). Daß große Mengen der Oxalsäure aus dem Stoffwechsel ausscheiden, ist mit ziemlicher Sicherheit auf die Bildung von Calciumoxalat zurückzuführen, das als unlösliche Substanz schlecht zugänglich ist. Auch aus den Versuchen mit  $C^{14}O_2$  geht hervor, daß die Oxalsäure am direkten Stoffwechsel kaum oder doch nur untergeordnet beteiligt ist.

Zu e). Die Gründe, warum es sich bei der  $CO_2$ -Fixierung im Dunkeln wahrscheinlich um eine Reaktion des Wood-Werkman-Typus handelt, wurden bereits dargelegt.

Zu f). Eine starke Nitratreduktion bei jungen Pflanzen ist bekannt. Sie steht sicher mit dem großen Wachstum und der Plasmabildung während des Keimlingsstadiums in Zusammenhang.

Aus der Diskussion ergibt sich ungefähr folgendes Bild für die Atmung von Tabak (Figur 9):



Hierbei ist zu beachten, daß der Krebscyclus nicht eingezeichnet ist. Es zeigt sich also deutlich, daß zwischen Tabak- und Succulentenatmung eine Analogie besteht, wohingegen von einer eigentlichen Zugehörigkeit des Tabaks zum Succulententypus nicht gesprochen werden kann.

Für eine solche Zugehörigkeit sprechen:

- der hohe RQ;
- die großen Mengen gespeicherter organischer Säuren;
- die Dunkelfixierung von  $CO_2$ .

Es sprechen jedoch die folgenden Gründe dagegen:

- Der hohe RQ ändert sich während einer Tagesperiode kaum und ist auch unter andern Bedingungen recht konstant.

- b) Der Gehalt an organischen Säuren ändert sich im Verlaufe einer Tagesperiode nur wenig.
- c) Die Dunkelfixierung geht bei Temperaturen von 25° C in beträchtlichem Maße vor sich.
- d) Das hohe Niveau des RQ von Tabakpflanzen kann sicher weder durch den Abbau gespeicherter organischer Säuren noch durch eine Nitratreduktion erklärt werden. (Bei Keimlingen läßt sich das Normalniveau auf Grund dieser beiden Vorgänge erklären.)

Es kann also gesagt werden, daß die Atmung von Tabak einen eigenen Typus darstellt, der in gewissen Merkmalen an jenen der Succulenten erinnert.

### 8. Zusammenfassung

1. Der RQ von Tabakpflanzen ist im Verlaufe eineinhalbstündiger Versuche unter allen Bedingungen weitgehend konstant und immer größer als eins. Er unterscheidet sich dadurch wesentlich von jenem der Vertreter des Succulententyps.
2. Die nichtflüchtigen organischen Säuren schwanken nur wenig während einer Tagesperiode und nehmen auch im Verlaufe von eineinhalbstündigen und längeren Versuchen nicht ab. Vielmehr ist in gewöhnlicher Luft eine Zunahme der organischen Säuren zu beobachten. Keimlinge machen dabei eine Ausnahme.
3. Eine Dunkelfixierung von CO<sub>2</sub> konnte nachgewiesen werden. Anhand der Verteilung der Radioaktivität erweist sich Äpfelsäure als erstes stabiles Produkt. Die Möglichkeit, daß eine Wood-Werkman-Reaktion vorliegt, wurde diskutiert und als sehr wahrscheinlich befunden.
4. Für Keimlinge wurde eine Beeinflussung des RQ durch die Nitratreduktion festgestellt.
5. Auf Grund der wesentlichen Unterschiede zwischen Tabak und Succulentenatmung wurde für Tabak ein neuer Typus der Atmung aufgestellt.

### Literaturverzeichnis

- A u d u s , L. J., 1935. Mechanical Stimulation and Respiration Rate in the Cherry Laurel. *New Phytol.*, **34**, 386.
- 1941. Mechanical Stimulation and Respiration in the green Leaf. *New Phytol.*, **40**, 86.
- B e n n e t - C l a r k , T. A., 1932. The Respiratory Quotient of Succulent Plants. *Sci. Proc. R. Dubl. Soc.*, **20**, 293.
- 1933. The Role of Organic Acids in Plant Metabolism. I. *New Phytol.*, **32**, 37
- 1933. The Role of Organic Acids in Plant Metabolism. II. *New Phytol.*, **32**, 128.
- 1933. The Role of Organic Acids in Plant Metabolism. III. *New Phytol.*, **32**, 197.
- 1937. Organic Acids of Plants. *Ann. Rev. Biochem.*, **6**, 579.

- Bonner, J., 1948. Biochemical Mechanisms in the Respiration of the Avena Coleoptile. *Arch. Biochem.*, **17**, 311.
- Bonner, W., and Bonner, J. 1948. The Role of Carbon Dioxide in Acid Formation by Succulent Plants. *Am. J. Bot.*, **35**, 113.
- Brown, F. A. Jr., Freeland, R. O., and Ralph, C. L., 1955. Persistent Rythms of O<sub>2</sub>-Consumption in Potatoes, Carrots and the Seaweed Fucus. *Plant Physiol.*, **30**, 280.
- Buhler, D. R., Hansen, E., Christensen, D. E., and Wang, C. H., 1956. The Conversion of C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub>C<sup>14</sup>O-COOH to Citric and Malic Acid in the Tomato Fruits. *Plant Physiol.*, **31**, 192.
- Bunning, E., 1956. Endogenous Rythms in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **7**, 71.
- McCready, R. M., Guggolz, J., Silvierra, V., and Owens, H. S., 1950. Determination of Starch and Amylose in Vegetables. *Anal. Chem.*, **22**, 1156.
- Duuren, J. A. van, 1953. The Determination of Organic Acids in Plant Material by Means of Paperchromatography. *Rec. Tra. Chim. Pays-Bas*, **72**, 889.
- Eichenberger, E., 1952. Über die Atmung lebender Tabakblätter. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **62**, 123.
- Evans, E. A. Jr., Vennesland, B., and Slotin, S., 1943. The Mechanism of Carbon Dioxide Fixation in Cell-free Extracts of Pigeon liver. *J. Biol. Chem.*, **147**, 771.
- Frey-Wyssling, A., und Waltz, P. Der Atmungsquotient der Tabakblätter. *Experientia*, **11**, 178.
- Gollub, M. C., and Vennesland, B., 1947. Fixation of Carbon Dioxide by a Plant Oxalacetate Carboxylase. *J. Biol. Chem.*, **169**, 233.
- Grob, K., 1948. Beitrag zur Kenntnis der Tabakfermentation. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **58**, 172.
- Handley, R., and Overstreet, R., 1955. Respiration and Salt Absorption by excised Barley Roots. *Plant Physiol.*, **30**, 419.
- Heierle, E., 1935. Blattfarbstoffuntersuchungen an einer grün- und gelbblättrigen Tabakvarietät. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, **44**, 17.
- Jacobson, L., 1955. Carbon Dioxide Fixation and Ion Absorption in Barley Roots. *Plant Physiol.*, **30**, 264.
- James, W. O., 1953. *Plant Respiration*. Clarendon Press, Oxford.
- Karlsson, B., and Eliasson, L., 1955. The RQ in different Parts of Wheat Roots in Relation to Growth. *Physiol. Plant*, **8**, 561.
- Krampitz, L. O., and Werkman, C. H., 1941. The enzymatic Decarboxylation of Oxalacetate. *Biochem. J.*, **35**, 595.
- Krebs, H. A., and Egglestone, L. V., 1944. Microdetermination of iso-Citric and cis-Aconitic acid in Biological material. *Biochem. J.*, **38**, 426.
- Lang, A., 1955. Entwicklungsphysiologie. *Fortschr. Bot.*, **18**, 767.
- Leonard, M. J. K., and Burris, R. H., 1947. A Survey of Transaminases in Plants. *J. Biol. Chem.*, **170**, 701.
- Moyse, A., 1955. Le métabolisme des acides organiques chez le Bryophyllum. *Physiol. Plant.*, **8**, 453.
- 1955. Le métabolisme des acides organiques chez le Bryophyllum II. *Physiol. Plant* **8**, 478.
- Munsche, D., 1955. Gibt es eine Nitrification in höheren Pflanzen? *Z. Pfl. Ernähr. Düng.*, **68**, 1.
- 1953. Über polarographische Nitratbestimmungen in pflanzenphysiologischen Versuchen. *Z. Pfl. Ernähr. Düng.*, **3**, 229.
- Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375.



- Ochoa, S., 1948. a) Biosynthesis of Tricarboxylic acids by Carbon Dioxide Fixation. I. J. Biol. Chem., **174**, 115.
- 1948. b) Biosynthesis of Tricarboxylic Acids by CO<sub>2</sub> Fixation. J. Biol. Chem., **174**, 133.
- Mehler, A. H., and Kornberg, A., 1948. a) Biosynthesis of Dicarboxylic Acids by Carbon Dioxide Fixation. J. Biol. Chem., **174**, 979.
- and Weisz-Tabori, E., 1948. b) Biosynthesis of Tricarboxylic Acids by Carbon Dioxide Fixation. II. J. Biol. Chem., **174**, 123.
- Paech, K., und Tracy, M. V., 1956. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. **1**. Springer-Verlag, Berlin.
- Palmer, J. K., 1955. Determination of Organic Acids by Ion Exchange Chromatography. Conn. Agr. Expt. Sta. Bull. 584.
- Pucher, G. W., 1942. The Organic Acids of the Leaves of Bryophyllum calycinum. J. Biol. Chem., **145**, 511.
- Leavenworth, C. S., Ginter, W. D., and Vickery, H. B., 1947. Studies on the Metabolism of Crassulacean plants. Plant Physiol., **22**, 1.
- — — 1947. Studies on the Metabolism of Crassulacean Plants. II. Plant Physiol., **22**, 360.
- — — 1947. Studies on the Metabolism of Crassulacean Plants. III. Plant Physiol., **22**, 477.
- — — 1948. Studies on the Metabolism of Crassulacean Plants. IV. Plant Physiol., **23**, 123.
- Wakeman, A. J., Vickery, H. B., 1937. The Metabolism of the Organic Acids of the Tobacco during Culture. J. Biol. Chem., **119**, 523.
- and Vickery, H. B., 1941. Succinic Acid as a Metabolite in Plant Tissues. Plant Physiol., **16**, 771.
- — 1942. On the Identity of the so-called Crassulacean Malic Acid with iso-Citric Acid. J. Biol. Chem., **145**, 525.
- — 1949. The Metabolism of the Organic Acids of the Tobacco Leaves. I. J. Biol. Chem., **178**, 557.
- Rautanan, N., 1946. Transamination in green Plants. J. Biol. Chem., **163**, 687.
- 1948. On the Formation of Aminoacids and Amides in green Plants. Acta Chem. Scand., **2**, 127.
- Rentschler, H., and Tanner, H., 1954. Über die Zusammensetzung der Fruchtsäuren von schweizerischen Obstsaften. Mitt. Lebensm. Hyg., **45**, 142.
- Rummen, G., 1953. Über einen Chemismus der Perzeption des Lichtreizes bei Pflanzen. Ber. Dtsch. Bot. Ges., **66**, 357.
- 1954. Redoxpotentiale und Aciditätspotentiale verschiedener pflanzlicher Organe und Gewebe. Ber. Dtsch. Bot. Ges., **67**, 335.
- Schwartz, P., 1933. Ein Beitrag zur Kenntnis des Säurestoffwechsels nichtsucculenter Pflanzen. Planta, **18**, 168.
- Somogyi, M., 1945. A new Reagent for the Determination of Sugars. J. Biol. Chem., **160**, 61.
- Thomas, M., 1949. Physiological Studies on Acid Metabolism in green Plants. I. New Phytol., **48**, 390.
- and Beever, H., 1949. Physiological Studies on Acid Metabolism in green Plants. II. New Phytol., **48**, 421.
- Ranson, S. L., 1954. Physiological Studies on Acid Metabolism in green Plants. III. New Phytol., **53**, 1.
- Ulrich, A., 1941. Metabolism of non volatile Organic Acids in excised barley-roots as related to Cation-Anion Balance during Salt Accumulation. Amer. J. Bot., **28**, 526.

- Umbreit, W. W., Burris, R. H., and Stauffer, J. F., 1945. Manometric Techniques and related Methods for the Study of Tissue Metabolism. Burgess Publ. Co., Minneapolis.
- Utter, M. F., and Wood, H. G., 1946. The Fixation of Carbon Dioxide in Oxalacetate by Pigeon Liver. *J. Biol. Chem.*, **164**, 455.
- Vennesland, B., 1949. The  $\beta$ -Carboxylases of Plants. *J. Biol. Chem.*, **178**, 591.
- Evans, E. A. Jr., and Altmann, K. I., 1947. The Effects of TPN and ATP on Pigeon Liver Oxalacetic Carboxylase. *J. Biol. Chem.*, **171**, 675.
- and Felsher, R. Z., 1946. Oxalacetic and Pyruvic Carboxylases in some Dicotyledonous Plants. *Arch. Biochem.*, **11**, 279.
- Gollub, M. C., and Spech, J. F., 1949. The  $\beta$ -Carboxylase of Plants. *J. Biol. Chem.*, **178**, 301.
- Vickery, H. B., 1955. The Metabolism of the Organic Acids of Tobacco Leaves. IX. *J. Biol. Chem.*, **217**, 83.
- and Pucher, G. W., 1940. Organic Acids of Plants. *Ann. Rev. Biochem.*, **9**, 529.
- Wartenberg, H., und Rummen, G., 1952/53. Studien über das physiologische Redoxpotential und den Chemismus seiner Steuerung. *Wiss. Z. Friedr.-Schiller- Univ., Jena*, 53.
- Webster, G. C., and Varner, J. E., 1955. Aspartate Metabolism and Asparagine Synthesis in Plant Systems. *J. Biol. Chem.*, **215**, 91.
- Wood, H. G., and Werkman, C. H., 1936. The Utilisation of CO<sub>2</sub> in the Dissimilation of Glycerol by the Propionic Acid Bacteria. *Biochem. J.*, **30**, 48.
- — 1940. The Fixation of CO<sub>2</sub> by Cellsuspensions of Propionic Bacterium *Pentosaceum*. *Biochem. J.*, **34**, 7.
-