Die Aufnahme von cAMP und seine Wirkungen auf den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel grüner Blätter

JÜRGEN WIEDMAIER und ULRICH KULL

Biologisches Institut der Universität Stuttgart

Cyclic AMP Uptake and its Effects on Carbohydrate and Lipid Metabolism of Green Leaves

Key Term Index: cAMP uptake, cAMP degradation, carbohydrates, photosynthesis, lipid metabolism; *Coleus blumei*, *Impatiens sultani*, *Petunia hybrida*.

Summary

When cAMP is fed to green plant tissues it is capable of entering cells and is degraded as rapidly in isolated protoplasts as in intact tissues. Effects of cAMP on carbohydrate storage are found when concentrations exceeding $8 \cdot 10^{-3}$ M are used; the rate of CO_2 -fixation is influenced by $> 2 \cdot 10^{-4}$ M cAMP. No effects on lipid fatty acid composition and metabolism could be established, but, after application of $> 4 \cdot 10^{-4}$ M cAMP, the incorporation of $[^{14}\text{C}]$ -acetate into lipids is raised approximately by 88 %. Also, cAMP lowers the formation of leaf-necroses caused by the detergent Tween 20. All effects caused by cAMP could also be obtained by feeding 5'-AMP, therefore these effects are non-specific and there is no indication of a hormone-mimicked efficacy of the cyclic nucleotide. In most cases a distinct effect needs a cAMP concentration higher than 10^{-4} M, and with regard to the rapid uptake, it seems probable that it is due to an influence on the adenylate pool of the cell. However, some rather specific cAMP effects described in the literature cannot be interpreted in such a manner.

Einleitung

Es ist bekannt, daß cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) im Stoffwechsel der Tiere eine wichtige Rolle, vor allem als Sekundär-messenger von Hormonen, spielt. Auch in Mikroorganismen und Algen ist cAMP nachgewiesen. Hingegen ist bei Kormophyten bis heute ein Vorkommen nicht gesichert (LIN 1974, AMRHEIN 1977). Eine kritische Betrachtung der vorliegenden Literatur (AMRHEIN 1977) spricht eher gegen das Auftreten; demgegenüber stehen immer wieder neue Berichte über cAMP-Nachweise (z. B. ISHERWOOD und RING 1977, SMELTZER und JOHNSON 1977). Über Enzyme des cAMP-Stoffwechsels sind die Daten ebenfalls widersprüchlich. Für ein Vorkommen von Adenylatecyclase in höheren Pflanzen gibt es nach AMRHEIN (1977) keinen sicheren Beweis. YUNGHANS und MORRÉ (1977) konnten das Enzym ebenfalls nicht nachweisen, dagegen liegen von RUTHEFORD et al. (1976) und SMELTZER und JOHNSON (1977) positive Befunde vor. Eine für 3',5'-cAMP spezifische Phosphodiesterase (EC 3.1.4.17) ist erstmals von BROWN et al. (1977) beschrieben worden.

Wirkungen von zugeführtem cAMP bei höheren Pflanzen sind bekannt: auch hier bleiben die Ergebnisse aber widersprüchlich. Verschiedene Entwicklungsvorgänge werden durch exogenes cAMP beeinflusst (MÜLLER 1973, BOPP 1975, SACHAR et al. 1975; neuere Ergebnisse ferner bei TRUELSEN et al. 1974, MALIK et al. 1976, NANDA und SHARMA 1976); die Beziehungen zu den Phytohormonen sind dabei völlig unklar (LIN 1974, SACHAR et al. 1975), obwohl cAMP einige Effekte von Gibberellinen, Auxinen und Cytokininen ebenfalls verursachen kann (Literatur bei SACHAR et al. 1975, WIEDMAIER 1976). Aktivitätsveränderungen verschiedener Enzyme nach cAMP-Zufuhr sind beschrieben worden (SACHAR et al. 1975, KAPOOR und SACHAR 1976, HABAGUCHI 1977, MARRIOTT und NORTHCOLE 1977), jedoch könnte es sich hierbei um weitgehend unphysiologische Vorgänge handeln (AMRHEIN 1977).

Bisher ist nicht untersucht, ob cAMP einen Einfluß auf den Kohlenhydrathaushalt, die Photosynthese und den Lipidstoffwechsel von grünem Pflanzengewebe hat. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst geprüft, inwieweit cAMP in die Pflanzenzellen aufgenommen wird, da von tierischen Zellen eine geringe Aufnahmerate bekannt ist. Über die Ergebnisse wurde kurz berichtet (WIEDMAIER und KULL 1976). Über den Einfluß von Phytohormonen auf den Kohlenhydrathaushalt und Lipidstoffwechsel der verwendeten Versuchspflanzen liegen zahlreiche Ergebnisse vor (Literatur bei WIEDMAIER 1976). Daher schien es möglich, Vergleiche mit eventuellen Wirkungen des cAMP anzustellen, um so einen Beitrag zur Klärung der Rolle des cAMP in höheren Pflanzen zu liefern.

Material und Methoden

Material

Als Versuchspflanzen wurden *Coleus blumei* BENTH., *Impatiens sultani* Hook und *Petunia hybrida* hort. verwendet. Blätter von *Petunia hybrida* dienten für Versuche mit isolierten Chloroplasten (Chloroplasten aus *Coleus*- oder *Impatiens*-Blättern zeigten eine wesentlich geringere Stabilität), und für Versuche mit isolierten Protoplasten (zur Isolierung von Protoplasten sind *Impatiens*-Pflanzen ungeeignet, da die in den Blättern enthaltenen Kristallnadeln die Protoplasten zum Teil zerstören).

Alle Pflanzen entstammten jeweils dem gleichen Klon und standen bis zu ihrer Verarbeitung entweder (im Winter) im Warmhaus unter natürlichen Lichtverhältnissen bei einer gleichbleibenden Temperatur von etwa 20 °C und einer hohen Luftfeuchtigkeit von 80 % oder (im Sommer) im Kalt haus (Temperatur und Luftfeuchtigkeit entsprechen weitgehend den Außenbedingungen) des Botanischen Gartens.

Methoden

Applikation von cAMP: Zur Herstellung der cAMP-Lösungen wurde eine entsprechende Menge cAMP mit destilliertem Wasser aufgenommen und mit etwa 0,5 n NaOH auf den pH-Wert der Kontrolle (destilliertes Wasser) eingestellt. Konzentrationen von cAMP über 100 ppm zeigen (ungepuffert) eine nennenswerte Erniedrigung des pH-Werts; dies täuscht nach Untersuchungen von BARENDSE und HOLTSLAG (1975) cAMP-Effekt vor, die in Wirklichkeit nur durch den niederen pH-Wert verursacht werden.

Bei den Langzeitversuchen wurden die Lösungen teils mit der Eppendorf-Pipette (0,01 ml) auf den Vegetationskegel von *Coleus*-Pflanzen aufgetragen (cAMP-Konzentrationen 10 ppm und 100 ppm), teils mit dem Pinsel durch möglichst gleichmäßiges Bestreichen der Blätter von *Coleus*- und *Impatiens*-Pflanzen appliziert (cAMP-Konzentrationen 1 ppm = $2,88 \cdot 10^{-6}$ M; 10 ppm; 100 ppm). Um eine

bessere Benetzung der Blätter zu erreichen, wurden den Lösungen geringe Mengen der oberflächenaktiven Substanz Tween 20 (Polyoxyäthylensorbitmonolaurat) beigemischt. Die Applikation von cAMP wurde mit 4 Wochen alten Stecklingen begonnen und erfolgte fünfmal in wöchentlichem Abstand.

Bei den Kurzzeitversuchen wurden isolierte Blätter von *Coleus*, *Impatiens* und *Petunia* durch Einstellen der Blattstiele (24 Std.) in cAMP-Lösung oder durch Vakuuminfiltration gefüttert; bei der letzteren ganze Blätter oder Blattscheiben in cAMP-Lösung getaucht und etwa 30 Min. im Exsikkator infiltriert.

Quantitative Bestimmung der cAMP-Gehalte: Die Bestimmung erfolgte nach der bei KULL und KÜHN (1975) beschriebenen Methode an Blattgewebe, Protoplasten und Chloroplasten. Zur Problematik des Nachweises von endogenem cAMP in Pflanzen mit diesem Verfahren vergleiche man AMRHEIN (1977). Der Nachweis in den Protoplasten fand nach der Fütterung (Blattstielfütterung oder Vakuuminfiltration) ganzer Blätter oder von Blattscheiben von *Petunia hybrida* mit cAMP (100–1000 ppm), anschließender Isolierung und mehrfachem Waschen der Mesophyll-Protoplasten statt. Bei einem Teil der Versuche wurden die Protoplasten vor der cAMP-Gehaltsbestimmung 15 bzw. 30 Min. mit cAMP-Phosphodiesterase (aus Rinderherz, 0,03 bzw. 0,06 units/ml Suspensionsmedium) inkubiert. Dadurch sollte möglicherweise an der Außenseite des Plasmalemmas adsorbiertes cAMP abgebaut werden.

Die cAMP-Bestimmung in Chloroplasten erfolgte nach Fütterung ganzer Blätter von *Petunia hybrida* mit cAMP (Vakuuminfiltration 60 Min., 250 ppm cAMP).

Protoplastenisolierung: Die Isolierung der Protoplasten erfolgte nach der Methode von POTRYKUS und DURAND (1972; vgl. auch HESS und POTRYKUS 1972 und HOPPMANN 1973).

Chloroplastenisolierung: Die Isolierung von Chloroplasten aus Blättern von *Coleus blumei*, *Impatiens sultani* und *Petunia hybrida* erfolgte nach der bei NOBEL (1967) beschriebenen Methode. Bei der Bestimmung des cAMP-Gehalts der Chloroplasten wurde der Chloroplasten-Niederschlag nochmals mit TES-Puffer gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung (siehe cAMP-Bestimmung) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Bestimmung der Zuckergehalte: Die Aufarbeitung und Extraktion des Pflanzenmaterials sowie die papierchromatographische Trennung und die quantitative Bestimmung der einzelnen Zucker erfolgte nach der von JEREMIAS (1958, 1965) und KULL (1965) beschriebenen Methode.

Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide: Aus dem stabilisierten Pflanzenmaterial wurde zunächst nach der Methode von BLIGH und DYER (1959) mit Chloroform-Methanol (2:1, V) das Rohfett extrahiert. Anschließend erfolgte die Verseifung der Fette, Methylierung der Fettsäuren und deren gaschromatographische Trennung nach dem bei KULL und JEREMIAS (1972) beschriebenen Verfahren. Reihenuntersuchungen ergaben, daß Gehaltsunterschiede bei den einzelnen Fettsäuren dann signifikant sind, wenn sie über 1,5–1,8% liegen.

Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung der Phospho-, Glyko- und Neutrallipide: Nach der Extraktion des Rohfetts erfolgt die Weiterverarbeitung nach der Methode von POUL et al. (1970) durch dünnschichtchromatographische Fraktionierung. Zur Identifizierung dienten neben Rhodamin-6-G auch Ninhydrin, α -Naphthol-Schwefelsäure und Ammoniummolybdat-Schwefelsäure (GOSWAMI und FREY 1971). Nach dem Besprühen wurden Phospho-, Glyko- und Neutrallipide mit Methanol extrahiert, durch Filtrieren vom Kieselgel abgetrennt und mit Natriummethylatlösung umgeestert. Die Meßgenauigkeit für die Phospho- und Glykolipide lag bei etwa 6%; dagegen zeigten die Neutrallipide wesentlich größere Schwankungen, etwa 15%.

[¹⁴C]-Acetat-Fütterung und Bestimmung der Markierungsverteilung im Rohfett und in den einzelnen Fettsäuren: Die Fütterung von *Impatiens*-Blättern mit [¹⁴C]-Acetat erfolgte im Anschluß an die Blattstielfütterung (mit 10–1000 ppm cAMP) nach der Methode von HAWKE et al. (1974) mit 15 μ Ci Na-[¹⁴C]-Acetat auf 2 g Blattmaterial 4 Std. lang. Danach wurde mit heißem Chloroform-

Methanol (4:1, V) versetzt und durch Erhitzen auf dem Wasserbad abgetötet. Nach mehrmaligem Auswaschen mit 1%iger Essigsäure, 0,1 m NaCl-Lösung und destilliertem Wasser wurde die Chloroform-Methanol-Lösung am Rotationsverdampfer eingedampft und unter Stickstoff in 4 ml Chloroform-Methanol (2:1, V) aufgenommen. Ein Zehntel dieser Rohfettlösung wurde auf Schälchen eingedampft. Anschließend wurde die Markierungsintensität im Methandurchflußzähler gemessen und die relative spezifische Rohfettaktivität bestimmt.

$$\text{Relative spezifische Rohfettaktivität} = \frac{\text{gemessene Markierungsintensität in Impulse/min}}{\text{Gewicht des eingesetzten Rohfetts in mg}}$$

Der Rest des Extrakts wurde für die Gaschromatographie weiterverarbeitet. Durch Einbau eines „Splitters“ am Ende der GC-Säule wurden neun Zehntel der Fettsäuremethylester durch ein auf 720 °C aufgeheiztes, mit Kupferoxid gefülltes Reaktorrohr geleitet (oxidativer Abbau) und die einzelnen Peaks über einen Dreiwegehahn in einer Mischung aus 5 ml Äthanolamin-Methanol (3:25, V) abgefangen und mit 10 ml Szintillationslösung (1 l Toluol + 5 g 2,5-Diphenyloxazol) versetzt. Die Bestimmung der Aktivität der Fettsäuren und der zwischen den Peaks liegenden Grundlinie erfolgte im Szintillationszähler (Packard 2420). Eine Aktivitätsmessung über das Proportionalzählrohr des Durchflußreaktors RGC 170 (Perkin-Elmer) führte wegen der schwachen Markierungsintensität zu schlechteren Ergebnissen.

Bestimmung der Photosyntheserate: Die Bestimmung erfolgte durch Applikation von $^{14}\text{CO}_2$ (30 Min.) nach der bei KULL und BAITINGER-HAARDT (1977) beschriebenen Methode. Nach der $^{14}\text{CO}_2$ -Zufuhr wurden die Blätter gewaschen, gewogen, mehrfach mit heißem Äthanol (80 %, 60 %) extrahiert und der Extrakt zur Trockne eingedampft. Dann wurde wie oben angegeben mit Szintillationslösung versetzt und ausgezählt.

Ergebnisse

Aufnahme und Abbau von cAMP

Bei Untersuchungen an tierischen Geweben und Zellen stellte man fest, daß cAMP die Zellmembran nur schlecht permeiert (LEVINE et al. 1969). Um zu prüfen, ob appliziertes cAMP die Zellen und das Zellinnere erreicht, wurde nach Zufuhr von cAMP in intaktes Blattgewebe der cAMP-Gehalt im Gewebe, in daraus isolierten Protoplasten und isolierten Chloroplasten untersucht.

Im Blattgewebe der Kontrollen von *Impatiens sultani* liegt die „cAMP“-Konzentration (bzw. die Konzentration der Substanz, die mit dem verwendeten Protein-Bindungstest als cAMP gemessen wird) bei 0,2–1,2 (durchschnittlich 0,5) pmol/mg Frischgewicht; bei *Petunia* erhält man „cAMP“-Werte zwischen 0,8 und 1,2 pmol/mg Frischgewicht (Durchschnitt: 1,1 pmol/mg Frischgewicht). Nach beendeter cAMP-Fütterung wurden Blattscheiben von Versuch und Kontrolle sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um den Abbau des gefütterten cAMP zu erkennen, wurden die anderen Blätter (Blattscheiben) entweder in destilliertes Wasser gestellt oder in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre aufbewahrt und im Abstand von 0,5, 1, 2, bis 24 Std. ebenso eingefroren. Man mißt sofort nach der Fütterung ganzer *Impatiens*-Blätter mit einer cAMP-Lösung von 100 ppm (Blattstielfütterung über 24 Std.) einen cAMP-Gehalt von 7,4 pmol/mg Frischgewicht; nach einer Stunde erhält man 2,4 pmol cAMP/mg Frischgewicht und nach etwa 3 Std. ist kein Unterschied im cAMP-Gehalt zwischen Versuch und Kontrolle festzustellen. Erfolgt die cAMP-Applikation durch Vakuuminfiltration ganzer Blätter oder von Blattscheiben, so ergeben sich entspre-

ehende Werte. Das Ergebnis einer Versuchsserie (von insgesamt 4) zeigt Abb. 1a. Im Blattgewebe von *Petunia* mißt man unmittelbar nach der Vakuuminfiltration (40 Min. 30 ppm cAMP) einen cAMP-Gehalt von 23,9 pmol/mg Frischgewicht; schon 2,5 Std. später ist zwischen Versuch und Kontrolle kein Unterschied mehr feststellbar (Abb. 1b). Auch hier streuen die gefundenen cAMP-Gehalte bei der Blattstielfütterung stärker, zeigen aber dieselbe Tendenz. Diese Befunde lassen erkennen, daß das aufgenommene cAMP im Blattgewebe von *Impatiens* und *Petunia* rasch abgebaut wird. Der cAMP-

Abb. 1. a) Zeitliche Veränderung des cAMP-Gehalts in Blattgewebe von *Impatiens sultani*. Vakuuminfiltration (40 Min.) von Blättern mit einer 20 ppm ($= 5,8 \cdot 10^{-5}$ M) cAMP-Lösung.

Abb. 1. b) Zeitliche Veränderung des cAMP-Gehalts in Blattgewebe von *Petunia hybrida*. Vakuuminfiltration (40 Min.) von Blättern mit einer 30 ppm ($= 8,6 \cdot 10^{-5}$ M) cAMP-Lösung.

Abbau gehorcht den Gesetzmäßigkeiten einer Reaktion 1. Ordnung bzw. Pseudo-1. Ordnung. Die Reaktionskonstante k ist dabei von der verwendeten Versuchspflanze abhängig.

Um zu klären, ob der cAMP-Abbau innerhalb der Zellen erfolgt oder schon am Plasmalemma, wie BREWIN und NORTHCOTE (1973) annehmen, schlossen sich weitere Untersuchungen mit Protoplasten an. Der „cAMP“-Gehalt der Kontrollen liegt im Durchschnitt bei 1,0 pmol/mg Protoplasten. Protoplasten aus mit cAMP-gefütterten Blättern enthalten dagegen selbst mehrere Stunden nach der Fütterung ein Vielfaches des „cAMP“-Gehalts der Kontrolle. In einem Versuch wurden 2 Std. nach der Applikation von 1000 ppm cAMP über den Blattstiel 47 pmol cAMP/mg Protoplasten gemessen (Abb. 2a). Zur Isolierung der Protoplasten sind etwa 2 Std. erforderlich. Daher mußte mit sehr hohen Konzentrationen von cAMP gefüttert werden, um nach der Isolierung noch genügend hohe cAMP-Gehalte finden zu können (vgl. WIEDMAIER und KULL 1976). In einem weiteren Versuch erhielt man 2,5 Std. nach Applikation von 250 ppm cAMP (Blattstielfütterung) 15,4 pmol cAMP/mg Protoplasten (Abb. 2b). Dies entspricht in beiden Fällen dem 26fachen des entsprechenden Kontrollwertes. 2 Std. nach der Vakuuminfiltration von Blattscheiben mit 100 ppm cAMP beträgt der cAMP-Gehalt der Protoplasten noch 5,8 pmol/mg Protoplasten (Abb. 2c). Dies entspricht dem 19fachen des Wertes der entsprechenden Kontrollen.

Um zu überprüfen, ob das applizierte cAMP nicht nur an der Außenseite des Plasmalemmas gebunden wird, sondern tatsächlich in das Zellinnere permeiert, wurden Versuche durchgeführt, bei welchen isolierte Protoplasten aus *Petunia*-Blättern mit cAMP-

Abb. 2. cAMP-Gehalte isolierter Protoplasten aus Blättern von *Petunia hybrida*, 2 Std. nach Ende der cAMP-Applikation.

Applikation: a) und b) über den Blattstiel, 24 Std.; c) durch Vakuuminfiltration von Blattscheiben, 25 Min.

spezifischer Phosphodiesterase inkubiert wurden. 2,5 Std. nach der Vakuuminfiltration (30 Min., 250 ppm cAMP) beträgt der cAMP-Gehalt der nicht mit Phosphodiesterase behandelten Protoplasten 10,7 pmol/mg Protoplasten, während eine Phosphodiesterasekonzentration von 0,03 bzw. 0,06 units/ml Suspensionsmedium (Inkubationszeit 15 bzw. 30 Min.) den cAMP-Gehalt um rund 15 % auf 9 pmol/mg Protoplasten verringert. Der cAMP-Gehalt der Kontrollen bleibt unabhängig von der Phosphodiesterasekonzentration gleich und liegt mit 1,0–1,3 pmol/mg Protoplasten wesentlich niedriger als in den Versuchen. Bei der Untersuchung der zeitlichen Veränderung des cAMP-Gehalts isolierter Protoplasten erhält man, soweit verfolgbar, eine sehr ähnliche Kurve wie bei Versuchen mit Blattgewebe (Abb. 3).

Abb. 3. Zeitliche Veränderung des cAMP-Gehaltes isolierter Mesophyllprotoplasten aus Blättern von *Petunia hybrida*.

Vakuuminfiltration (30 Min.) mit 100 ppm ($= 2,9 \cdot 10^{-4}$ M) cAMP-Lösung.

Vor dem Einfrieren der Protoplasten in flüssigem Stickstoff wurde mit 0,5 m Mannit (pH 5,4) gewaschen. Der cAMP-Gehalt des Waschwassers liegt, sofern überhaupt meßbar, stets weit unter dem cAMP-Gehalt, der in den Protoplasten der Kontrollversuche gefunden wurde.

In isolierten Chloroplasten beträgt der cAMP-Gehalt eine Stunde (diese Zeit ist zur Chloroplastenisolierung erforderlich) nach der Vakuuminfiltration (60 Min., 250 ppm cAMP) ganzer Blätter von *Petunia* 4 pmol/mg Chloroplasten, er liegt damit um über 400 % höher als in den Kontrollen (vgl. WIEDMAIER und KULL 1976).

Vergleich des cAMP-Gehalts im Blattgewebe und in isolierten Protoplasten

In ganzen Blättern von *Petunia hybrida*, die 24 Std. über den Blattstiel mit 1000 ppm cAMP-Lösung gefüttert wurden, beträgt die mit dem Protein-Bindungs-Test festgestellte cAMP-Konzentration 2 Std. nach Ende der cAMP-Fütterung 32–66 pmol/mg

Blattfrischgewicht. In isolierten Protoplasten aus *Petunia*-Blättern (Fütterungszeit und cAMP-Konzentration wie oben) ergibt sich 2 Std. nach Ende der cAMP-Applikation mit 28–52 pmol cAMP/mg Protoplasten ein vergleichbarer cAMP-Gehalt.

Protoplasten aus vakuuminfiltrierten *Petunia*-Blättern (Fütterungszeit 25 Min., cAMP-Konzentration 100 ppm) zeigen 2 Std. nach Fütterungsende einen cAMP-Gehalt von 4,5–5,8 pmol/mg Protoplasten. Im Blattgewebe ergeben sich 2 Std. nach der Vakuuminfiltration mit nur 30 ppm cAMP 1,5 pmol cAMP/mg Blattfrischgewicht — umgerechnet auf die obige cAMP-Konzentration von 100 ppm entspricht dies 4,8 pmol cAMP/mg Blattfrischgewicht. Dieser Wert liegt wiederum recht nahe dem in Protoplasten ermittelten cAMP-Gehalt.

Die Vergleiche zeigen, daß unter Berücksichtigung der verschiedenen Bezugsgrößen die cAMP-Konzentration bei sich entsprechenden Versuchen im Blattgewebe ähnlich hoch ist wie in isolierten Protoplasten. Auch dies deutet darauf hin, daß das cAMP rasch in die Zellen aufgenommen wird und der Abbau dann im Zellinnern (im Protoplasten) erfolgt.

Längenwachstum bei Impatiens sultani und Coleus blumei

Um zu prüfen, ob cAMP einen Einfluß auf das Längenwachstum der verwendeten Pflanzen hat, wurde die Wachstumsrate der Versuchspflanzen bestimmt. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigten weder die *Impatiens*-Versuchsreihen, die mit 1, 10 und 100 ppm cAMP (Bestreichen der Blätter) behandelt wurden, noch die *Coleus*-Pflanzen (Bestreichen der Blätter mit 1, 10 und 100 ppm cAMP und Applikationen über den Vegetationskegel mit 100 ppm cAMP) signifikante Unterschiede im Längenwachstum.

Einfluß von cAMP auf den Kohlenhydrathaushalt

In Blättern von *Coleus* erfolgte nach der Langzeitbehandlung der Pflanzen mit cAMP (Applikation von 1–100 ppm, entsprechend $2,88 \cdot 10^{-6}$ bis $2,88 \cdot 10^{-4}$ M Lösungen) und nach Kurzzeitapplikation (24 Std.) des cAMP (bis 1000 ppm = $2,88 \cdot 10^{-3}$ M) keine Veränderung der Zuckergehalte aller einzelnen Zucker im Rahmen der Meßgenauigkeit von 0,1 % des Trockengewichts. Dasselbe ergab sich in weiteren Meßreihen für *Impatiens*. Erst bei Konzentrationen von 3000 ppm ($8,64 \cdot 10^{-3}$ M) und 5000 ppm ($1,44 \cdot 10^{-2}$ M) nehmen in *Impatiens* die Gehalte an Fructose (um 0,2 bzw. 0,4 %) und Saccharose (um 0,3 bzw. 0,6 %) zu. Die Menge an Glucose ändert sich nicht. Der gefundene Effekt wurde durch Wiederholung der Versuchsreihen gesichert.

Einfluß von cAMP auf die Photosyntheserate

Wie Tabelle 1 zeigt, erfolgt nach 24stündiger Fütterung von cAMP bei Anwendung von 100 ppm eine Erhöhung der CO_2 -Einbaurrate, bei 1000 ppm hingegen eine deutliche Verminderung gegenüber den mit Wasser gefütterten Kontrollen. Versuche mit entsprechenden Konzentrationen von 5'-Adenosinmonophosphat (5'-AMP) zeigen die Effekte aber ebenso; es liegt also keine spezifische cAMP-Wirkung vor.

Tabelle 1. *Einfluß von cAMP und 5'-AMP auf die Photosyntheserate, in Blättern von Coleus blumei*
 CO_2 -Einbaurate in cpm/g Blattfrischgewicht nach 24stündiger Zufuhr von cAMP bzw. 5'-AMP und
 30 Min. Photosynthese in $^{14}\text{CO}_2$ (Mittelwerte aus 3 Parallelversuchen)

Konzentration an cAMP bzw. 5'-AMP	H ₂ O (Kontrolle)	cAMP	5'-AMP
100 ppm	4402 (100 %)	5950 (+35 %)	6248 (+42 %)
250 ppm	4228 (100 %)	3259 (−23 %)	4329 (+ 2 %)
1000 ppm	6062 (100 %)	2316 (−62 %)	3154 (−48 %)

Einfluß von cAMP auf die Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide

In den untersuchten Proben von *Coleus blumei* und *Impatiens sultani* wurden folgende Fettsäuren gaschromatographisch bestimmt:

Palmitinsäure (16:0), eine Hexadecensäure (16:1), eine Hexadecatriensäure (16:3), Stearinsäure (18:0), Ölsäure (18:1), Linolsäure (18:2) und Linolensäure (18:3). Fettsäuren mit einer niedrigeren Retentionszeit als Palmitinsäure (16:0) sind nur in geringen Mengen vorhanden und wurden daher als „niedere Fettsäuren“ zusammen bestimmt. Fettsäuren mit Kettenlängen über C₁₈ waren entweder gar nicht nachweisbar oder kamen nur in sehr geringen Mengen (unter 3% der Gesamtfettsäuren) vor. Sie wurden deshalb bei den Berechnungen nicht berücksichtigt.

In *Coleus* ist Linolensäure mit einem Anteil von durchschnittlich 47% des Gesamtfettsäuregehalts die mengenmäßig vorherrschende Fettsäure, gefolgt von Palmitinsäure mit 20% und Linolsäure mit 19%. Der Gehalt der anderen Fettsäuren liegt jeweils unter 5%. Sowohl bei den Langzeitversuchen (bis 100 ppm cAMP) als auch bei der 24stündigen cAMP-Fütterung von Blättern (bis 1000 ppm cAMP) beobachtet man bei keiner der Fettsäuren einen signifikanten Gehaltsunterschied gegenüber der jeweiligen Kontrollserie.

Bei *Impatiens* sind die durchschnittlichen Gehalte an Linolen- und Palmitinsäure von ähnlicher Höhe wie bei *Coleus*, der Linolsäuregehalt ist hingegen erheblich niedriger. Auch hier erbrachten alle angewandten cAMP-Konzentrationen keine Mengenveränderungen gegenüber den Kontrollen.

Selbst cAMP-Konzentrationen, die im Kohlenhydrathaushalt Änderungen hervorrufen (3000 und 5000 ppm), ergeben im Fettsäuremuster der Gesamtlipidfraktion Unterschiede, die mit 0,3 bzw. 0,2% bei der Linolensäure und 0,4 bzw. 0,1% bei der Linolsäure eindeutig innerhalb der Meßgenauigkeit liegen.

Auch bei gleichzeitiger Zufuhr von cAMP (10–1000 ppm) und Theophyllin (10^{−5} und 10^{−4} M) erfolgt keine Veränderung des Fettsäure-Musters gegenüber den Kontrollen. Theophyllin allein beeinflußt die Fettsäure-Zusammensetzung ebenfalls nicht.

Einfluß von cAMP auf die Fettsäurezusammensetzung der Phospho- und Glykolipide

Bestimmt man die Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide, so läßt sich nichts über die Fettsäuren der Fraktionen der Neutrallipide, der Glykolipide und der Phospholipide aussagen. Es besteht die Möglichkeit, daß Unterschiede im Fettsäuremuster dieser

Lipidfraktionen auftreten, die innerhalb der drei Gruppen so weit ausgeglichen werden, daß sie beim Gesamtgehalt an Fettsäuren nicht erkennbar sind. Deshalb wurde parallel zu den Untersuchungen der Fettsäurezusammensetzung der Gesamtlipide diejenige der einzelnen Fraktionen untersucht. Die Fettsäurezusammensetzung der Phospholipidfraktion ist bei Blättern von *Coleus* und *Impatiens* ähnlich (Palmitinsäure 32–35%; Linolsäure 15–30%; Linolensäure 25–35%). Eine Veränderung gegenüber den jeweiligen Kontrollen bei Fütterung von cAMP (bei *Coleus* bis 1000 ppm, bei *Impatiens* bis 5000 ppm) erfolgt nicht. Die Glykolipidfraktion enthält stets über 70% Linolensäure, 4–10% Linolsäure und 8–18% Palmitinsäure. Auch hier ist keine Änderung des Fettsäuremusters unter dem Einfluß von cAMP festzustellen.

Einfluß von cAMP auf die Fettsäurezusammensetzung der Chloroplastenlipide

Cytokinine beeinflussen den Lipidhaushalt der Chloroplasten (DONALDSON et al. 1969, SCHWEIZER et al. 1977). Wenn cAMP ein Sekundärmediator von Cytokinen wäre (WOOD et al. 1972, 1973), so sollte es entsprechende Wirkungen zeigen. Um dies zu prüfen, wurden isolierte Chloroplasten mit cAMP der Konzentration 10, 100, 250 und 500 ppm inkubiert. Die Behandlungszeit variierte zwischen 30 Min und 2 Std.

Da isolierte Chloroplasten von *Impatiens* und *Coleus* rasch altern (verursacht durch Phenoxidasen?), wurden diese Versuche vorwiegend mit *Petunia*-Chloroplasten durchgeführt. Ein Einfluß von cAMP auf die prozentuale Verteilung der Fettsäuren war nicht zu erkennen. Nach 2stündiger Inkubation mit cAMP ist ebenso wie in den Kontrollen der Linolensäuregehalt um etwa 10% abgesunken. Durch cAMP kann also dieser alterungsbedingte Abbau nicht aufgehoben werden.

Einfluß von cyclischem und nichtcyclischem Adenosinmonophosphat auf den Einbau von ^{14}C -Acetat in Lipide

Um Hinweise auf einen möglichen Einfluß von cAMP auf die Biosynthese der Fettsäuren zu erhalten, wurden Blätter von *Impatiens* im Anschluß an die Blattstielfütterung (24 Std.) mit 10–1000 ppm cAMP 4 Std. mit [^{14}C]-Acetat gefüttert und die Markierungsverteilung in Rohfett und Fettsäuren bestimmt. Die relative spezifische Rohfettaktivität in den Versuchen 10 und 100 ppm unterscheiden sich (innerhalb der Meßgenauigkeit) nicht von der Rohfettaktivität in den Kontrollen. Höhere cAMP-Konzentrationen (250, 500 und 1000 ppm) bewirken jedoch einen starken Anstieg der Markierungsintensität um durchschnittlich 88% (Abb. 4).

Um die Spezifität dieser cAMP-Wirkung zu überprüfen, wurde in einer weiteren Versuchsreihe nichtcyclisches Adenosin-5'-monophosphat (AMP) appliziert. In diesem Fall bewirken schon 100 ppm AMP eine Erhöhung der Einbaurate um 67%. Eine Steigerung der AMP-Konzentration auf 500 ppm ergibt eine Markierungszunahme von 71% und bewirkt damit einen Effekt gleicher Größenordnung wie 1000 ppm cAMP (+74%).

Die Untersuchung der Markierung der einzelnen Fettsäuren ergibt folgendes Bild: Obwohl Linolensäure mit 50–60% die mengenmäßig wichtigste Fettsäure ist, enthält sie auch nach 4stündiger Fütterung mit [^{14}C]-Acetat eine nur sehr geringe Aktivität (1,1% der Gesamtaktivität). Eine wesentlich höhere Biosyntheserate zeigen Linolsäure

Abb. 4. Relative spezifische Aktivität des Rohfettes in Blättern von *Impatiens sultani* nach Fütterung von cAMP bzw. 5'-AMP und [14 C]-Acetat.

Fütterung: angegebene Menge von cAMP bzw. 5'-AMP über 24 Std., anschließend Zufuhr von [14 C]-Acetat (15 μ Ci, 4 Std.). Gemessen: Impulse/Min. je mg Rohfett.

mit 17 %, Ölsäure mit 30 % und Palmitin- und Hexadecensäure (gemeinsam) mit 35 % der Gesamtaktivität. Die mit cAMP (10–1000 ppm) behandelten Proben zeigen bei den einzelnen Fettsäuren 14 C-Einbauraten, die bis zu 9 % vom Kontrollversuch abweichen. Da aber die Meßgenauigkeit in dieser Größenordnung liegt (etwa 10 %) und die Abweichungen unregelmäßig auf die einzelnen Versuche verteilt sind, müssen diese Unterschiede als Meßfehler gelten.

Einfluß von cyclischem und nichtcyclischem Adenosinmonophosphat auf die durch Tween 20 hervorgerufene Blattschädigung

Coleus- und *Impatiens*-Pflanzen, die bei der Applikation von cAMP über die Blätter versehentlich eine zu hohe Konzentration der oberflächenaktiven Substanz Tween 20 erhalten hatten, zeigten Blattnekrosen und starken Blattfall. Dieser war bei den Kontrollen (Wasser mit Tween 20, ohne cAMP) erheblich ausgeprägter als bei gleichzeitiger

Tabelle 2. Blattfall bei *Impatiens* und *Coleus* in Abhängigkeit von der zugeführten Tween-20- und cAMP-Menge

Zahl der abgefallenen Blätter in % der bei den Kontrollen abgefallenen; untersucht jeweils 15 Pflanzen

Wochen	Impatiens 2 % Tween 20			Impatiens 3,3 % Tween 20					Coleus 5 % Tween 20				
	1	2	3	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
cAMP													
10 ppm	56	68	70	46	48	81	92	96	82	84	87	87	88
100 ppm	50	59	64	23	25	37	48	70	64	78	81	84	86

Tabelle 3. Blattfall bei *Impatiens* in Abhängigkeit von der zugeführten Tween 20- und cAMP- bzw. 5'-AMP-Menge

Zahl der abgefallenen Blätter in % der bei den Kontrollen abgefallenen; untersucht jeweils 15 Pflanzen

Wochen	2 % Tween 20			3,3 % Tween 20		
	1	2	3	1	2	3
cAMP						
250 ppm	50	81	85	80	—	—
500 ppm	40	70	81	71	90	94
5'-AMP						
250 ppm	35	56	58	57	67	91
500 ppm	35	46	48	43	63	80

Zufuhr von cAMP (Tabelle 2). Daher wurde in mehreren Versuchsreihen nachgeprüft, inwieweit hier ein spezifischer Effekt vorliegt (Tabelle 3). Je höher die cAMP-Konzentration ist, um so geringer bleibt die Schädigung der Blätter. Bei Anwendung von 5'-AMP erhält man aber bei entsprechenden Konzentrationen eine ebenso gute oder bessere Schutzwirkung. Eine Blattschädigung durch das Detergens Triton X-100, angewendet in gleicher Konzentration wie Tween 20, wird weder durch cAMP noch durch 5'-AMP verringert.

Diskussion

Bei Arbeiten, welche die Funktion von cAMP durch Applikation des cyclischen Phosphats zu klären versuchen, erhebt sich zunächst die Frage, inwieweit das zugeführte cAMP überhaupt von der Zelle aufgenommen wird. So erklären DUFFUS und DUFFUS (1969) die geringere Wirkung von cAMP als von Gibberellinsäure auf die Induktion der α -Amylase mit einer weniger guten cAMP-Aufnahme. Ähnliche Erklärungen stammen von NICKELLS et al. (1971) sowie von BARTON et al. (1973). BREWIN und NORTHCOTE (1973) kommen zu dem Schluß, daß cAMP an der Membran abgebaut wird, das cAMP-Molekül also nicht in intakter Form in die Zelle gelangt. GIANNATTASIO et al. (1974) stellen bei Untersuchungen an *Helianthus-tuberosus*-Knollen fest, daß cAMP rasch ins Gewebe aufgenommen und dort abgebaut wird. Es wird wahrscheinlich gemacht, daß dies im Zellinnern geschieht. Eine gute Aufnahme von cAMP in Gewebe ist auch von GORDON et al. (1973) festgestellt worden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eindeutig, daß cAMP nicht nur ins Gewebe aufgenommen wird, sondern ohne größere Schwierigkeiten durch das Plasmalemma in die Zelle und dort auch in die Chloroplasten gelangt. In allen durchgeführten Versuchen zeigen die mit cAMP behandelten Blätter ein Mehrfaches des „cAMP“-Gehaltes der unbehandelten Proben. Die Höhe des in isolierten Protoplasten und Chloroplasten gefundenen cAMP-Gehalts und die Tatsache, daß appliziertes cAMP sehr rasch abgebaut wird, sowie die Untersuchungen der mit Phosphodiesterase inkubierten Protoplasten lassen erkennen, daß zugeführtes cAMP

schnell ins Zellinnere gelangt. Dies wird auch durch neue Untersuchungen von KATAOKA (1977) bestätigt. Ein Transport von cAMP durch die Chloroplastenhülle ist ferner von WELLBURN und HAMPP (1976) festgestellt worden. Diese Ergebnisse bedeuten aber, daß Untersuchungen, bei denen cAMP nur eine schwächere Wirkung als das entsprechende Phytohormon zeigt, gegen eine Sekundär-messenger-Rolle von cAMP sprechen.

Der in den Blättern von *Impatiens* und *Petunia* ohne cAMP-Fütterung gemessene Gehalt an „cAMP“ liegt in einer Größenordnung, die mit den Angaben anderer Autoren übereinstimmt (vgl. KULL und KÜHN 1975). Da jedoch unklar ist, was hierbei gemessen wird (AMRHEIN 1977), wird hier nicht weiter darauf eingegangen.

Die Untersuchung der cAMP-Abbaurates zeigt, daß appliziertes cAMP rasch abgebaut wird; 0,5–1 Std. nach Fütterungsende beträgt der gemessene cAMP-Gehalt nur noch die Hälfte des Anfangswertes, nach etwa 4 Std. ist zumeist kein Unterschied mehr zu den Kontrollen meßbar. Die Vergleiche der cAMP-Gehalte in ganzen Blättern und in isolierten Protoplasten (es ergaben sich bei einander entsprechenden Versuchen gleiche cAMP-Gehalte) lassen ebenfalls erkennen, daß der cAMP-Abbau innerhalb der Protoplasten erfolgt. In Übereinstimmung damit ergeben sich in ganzen Blättern und in Protoplasten — soweit verfolgbar — deckungsgleiche cAMP-Abbaukurven.

Auf die Zuckergehalte hat cAMP im Gegensatz zu den Phytohormonen keinen Einfluß. Nur bei extrem hohen cAMP-Konzentrationen (ab $8 \cdot 10^{-3}$ M) sind Effekte nachzuweisen. Diese können mit einer bei solchen Konzentrationen wirksamen Beeinflussung des Adenylatpools erklärt werden. Die CO_2 -Fixierungsrate wird zwar durch cAMP deutlich verändert; jedoch zeigen die Kontrollexperimente mit 5'-AMP, daß es sich dabei nicht um eine spezifische Wirkung handelt. Vermutlich ist auch in diesem Fall die Veränderung des Adenylatpools die Ursache. Eine Stimulation der CO_2 -Fixierung in isolierten Erbsenchloroplasten durch ähnliche geringe Konzentrationen von Adenosinphosphaten ist von ROBINSON und WISKICH (1976) beobachtet worden. Die hemmende Wirkung höherer cAMP- und AMP-Konzentrationen könnte mit einer verstärkten ATP-Bildung (z. B. durch cyclische Phosphorylierung) zusammenhängen. Auf die Fettsäurezusammensetzung des Rohfetts, der Phospho- und der Glykolipide sowie der Chloroplastenlipide hat cAMP in Konzentrationen von $2,9 \cdot 10^{-7}$ M bis $1,4 \cdot 10^{-2}$ M keinen Einfluß. Es ist daher ziemlich sicher, daß cAMP in den Fettsäurehaushalt nicht eingreift. Cytokinine rufen schon in Konzentrationen um 10^{-6} M deutliche Veränderungen im Fettsäuremuster hervor (KULL et al., unveröff.). In Chloroplasten hemmen sie den alterungsbedingten Linolensäure-Abbau. Darauf hat cAMP ebenfalls keinen Einfluß. In grünen Blättern kann cAMP somit nicht Sekundär-messenger der Cytokinine sein oder cytokininähnliche Wirkungen im Sinne von DE NICOLA et al. (1975) hervorbringen.

Bei Anwendung von cAMP-Konzentrationen über $2,9 \cdot 10^{-4}$ M wird der Einbau von ^{14}C -Acetat in Lipide deutlich verstärkt. Dieser Effekt wird aber durch 5'-AMP ebenso hervorgerufen, so daß auch hier keine spezifische Wirkung vorliegt. Das Auftreten eines meßbaren Effekts erst ab Konzentrationen von über 10^{-4} M deutet auch in diesem Fall auf eine Wirkung über den Adenylatpool. Ein Einfluß von cAMP auf die Biosynthese der einzelnen Fettsäuren konnte nicht beobachtet werden. Die von KANNAN-

GARA und STUMPF (1972) an Spinatchloroplasten festgestellte cAMP-induzierte Hemmung der Lipidsynthese und der Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren kann nur beschränkt mit unseren Ergebnissen verglichen werden, da wir ganze Blätter, jene Autoren aber isolierte Chloroplasten untersucht haben. Außerdem finden KANNANGARA und STUMPF die Verringerung der Markierungsintensität der mehrfach ungesättigten Fettsäuren nur in den inneren, blaßgrünen Spinatblättern und mit maximal 3,7% liegt diese Markierungsabnahme unter der von uns erreichten Meßgenauigkeit.

Bei der beobachteten Schutzwirkung von cAMP auf die Blattschädigung durch Tween 20 handelt es sich ebenfalls um einen unspezifischen Effekt.

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Wirkungen von cAMP auf den Stoffwechsel können auch mit 5'-AMP erzielt werden. Da sie zumeist erst bei relativ hohen Konzentrationen deutlich werden, dürften sie alle durch die Beeinflussung des Adenylatpools zustande kommen, wie dies MÜLLER schon 1973 zur Diskussion stellte. Auch andere Autoren haben unspezifische cAMP-Wirkungen nachgewiesen (SCHRAUDOLF 1972, 1977, NANDA et al. 1976, FAROOQUI und MAHESHWARI 1977). Wenn Effekte von cAMP festzustellen sind, müssen sie daher stets mit denjenigen von 5'-AMP verglichen werden. Dies ist in zahlreichen Untersuchungen nicht geschehen. Wenn 5'-AMP ohne Wirkung bleibt, sollten andere Adenosinmonophosphate getestet werden (vgl. SCHRAUDOLF 1977). Sehr hohe cAMP-Konzentrationen könnten ferner das Zellgeschehen pathologisch beeinflussen (vgl. BRESSAN et al. 1976) und schließlich tritt in cAMP-Lösungen von über 100 ppm ohne Abpufferung eine nennenswerte Veränderung des pH-Wertes ein (BARENDSE und HOLTSAG 1975).

In mehreren Arbeiten sind allerdings spezifische Wirkungen von cAMP auf Enzymaktivitäten beschrieben worden, die durch diese Einwände nicht zu entkräften sind (vgl. Einleitung). Auch die Befunde von TARANTOWICZ-MAREK und KLECZKOWSKI (1975) über die Wirkung von 10^{-7} M cAMP auf die Synthese von hn-RNA können nicht als unspezifisch angesehen werden.

Für einige wertvolle Hinweise danken wir Herrn Prof. Dr. N. AMRHEIN. Für sorgfältige Mitarbeit haben wir Frl. BARBARA KÜHN, für eine Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft zu danken.

Literatur

- AMRHEIN, N.: The current status of cyclic AMP in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**, 123—132 (1977).
- BARENDSE, G. W. M., and HOLTSAG, G. T. M.: Evidence against the involvement of adenosine-3':5'-cyclic monophosphate in gibberellic acid-mediated growth as studied in *Pharbitis nil*. *Plant Sci. Lett.* **4**, 217—223 (1975).
- BARTON, K. A., VERBEEK, R., ELLIS, R., and KHAN, A. A.: Abscise acid inhibition of gibberellic acid and cyclic-3',-5'-adenosine monophosphate-induced α -amylase synthesis. *Physiol. plantarum* **29**, 186—189 (1973).
- BIGH, E. G., and DYER, W. J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canad. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911—917 (1959).
- BOPP, M.: Entwicklungsphysiologie. *Fortschr. Botanik* **37**, 155—176 (1975).

- BRESSAN, R., ROSS, C., and VANDEPEUTE, J.: Attempts to detect cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in higher plants by three assay methods. *Plant Physiol.* **57**, 29—37 (1976).
- BREWIN, N. J., and NORTHCOTE, D. H.: Variations in the amounts of 3',5'-cyclic AMP in plant tissues. *J. exp. Bot.* **24**, 881—888 (1973).
- BROWN, E. G., AL-NAJAFI, T., and NEWTON, R. P.: Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* **16**, 1333—1337 (1977).
- DE NICOLA, G. M., ARNICO, V., and PIATTELLI, M.: Effects of light and kinetin on amaranthin synthesis induced by cyclic AMP. *Phytochemistry* **14**, 989—991 (1975).
- DONALDSON, R., LOESCHER, W., and NEWMAN, D. W.: The influence of kinetin and antimetabolites on the synthesis of fatty acids in leaves. *Amer. J. Bot.* **56**, 1167—1172 (1969).
- DUFFUS, C. M., and DUFFUS, J. H.: A possible role for cyclic AMP in gibberellic acid triggered release of α -amylase in barley endosperm slices. *Experientia* **25**, 581 (1969).
- FAROOQUI, A. H. A., and MAHESHWARI, S. C.: Does cAMP stimulate nitrate reductase level in fenugreek cotyledons? *Biochem. Physiol. Pflanzen* **171**, 231—234 (1977).
- GIANNATTASIO, M., MANDATA, E., and MACCHIA, V.: Content of 3',5'-cyclic AMP and cyclic AMP-phosphodiesterase in dormant and activated tissues of Jerusalem artichoke tubers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **57**, 365—371 (1974).
- GORDON, S. A., CAMERON, E., and MILLER, J. S.: Polarity and the rate of transport of cyclic adenosine-3',5'-monophosphate in the coleoptile. *Plant Physiol.* **52**, 105—110 (1973).
- GOSWAMI, S. K., and FREY, F. G.: Spray detection of phospholipids on thinlayer chromatograms. *J. Lipid Res.* **12**, 509—510 (1971).
- HABAGUCHI, K.: A possible function of cyclic AMP in the induction of polyphenol oxidase preceding root formation in cultured carrot-root callus. *Plant Cell Physiol.* **18**, 191—198 (1977).
- HAWKE, J. C., RUMSBY, M. G., and LEECH, R. M.: Lipid biosynthesis in green leaves of developing maize. *Plant Physiol.* **53**, 555—561 (1974).
- HESS, D., and POTRYKUS, I.: Teilung isolierter Protoplasten von *Petunia hybrida*. *Naturwissensch.* **59**, 273—274 (1972).
- HOFFMANN, F.: Die Aufnahme doppelt-markierter DNS in isolierte Protoplasten von *Petunia hybrida*. *Z. Pflanzenphysiol.* **69**, 249—261 (1973).
- ISHERWOOD, F. A., and RING, S. G.: Adenosine cyclic monophosphate in potato tubers during storage at +10° and +2°. *Phytochemistry* **16**, 309—310 (1977).
- JEREMIAS, K.: Über den Jahresgang einiger Zucker von *Hedera helix* L. *Planta* **52**, 195—205 (1958).
- Der Einfluß des Welkens auf den Zucker- und Stärkegehalt isolierter Blätter von *Teucrium chamaedrys* und *Brunella grandiflora*. *Planta* **65**, 73—82 (1965).
- KANNANGARA, C. G., and STUMPF, P. K.: Fat metabolism in higher plants. L. The biosynthesis of polyunsaturated fatty acids by isolated spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **148**, 414—424 (1972).
- KAPOOR, H. C., and SACHAR, R. C.: Stimulation of ribonuclease activity and its isoenzymes in germinating seeds of cowpea (*Vigna sinensis*) by gibberellic acid and adenosine-3',5'-cyclic monophosphate. *Experientia* **32**, 558—560 (1976).
- KATAOKA, H.: Phototropic sensitivity in *Vaucheria geminata* regulated by 3',5'-cyclic AMP. *Plant Cell Physiol.* **18**, 431—440 (1977).
- KULL, U.: Über das Vorkommen und das physiologische Verhalten der Sedoheptulose im Rahmen des Kohlenhydrathaushaltes vegetativer Pflanzenteile. *Beitr. Biol. Pflanzen* **41**, 231—300 (1965).
- und JEREMIAS, K.: Die Fettsäurezusammensetzung der verseifbaren Lipide aus Rinden von *Populus balsamifera* im Jahresgang. *Z. Pflanzenphysiol.* **68**, 55—62 (1972).
- und KÜHN, B.: Influence of zeatin and gibberellin on adenosine-3',5'-cyclic monophosphate levels of *Impatiens* leaves. *Z. Naturforschg.* **C 30**, 69—72 (1975).

- KULL, U., and BAITINGER-HAARDT, C.: Physiology of ribohexulose (D-allulose) and allitol in *Itea* plants. *Z. Pflanzenphysiol.* **82**, 301—309 (1977).
- LEVINE, R. A., LEWIS, S. E., SHULMAN, J., and WASHINGTON, A.: Metabolism of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-8-¹⁴C by isolated, perfused rat liver. *J. biol. Chem.* **224**, 4017—4022 (1969).
- LIN, P. P.-G.: Cyclic nucleotides in higher plants? *Adv. Cycl. Nucl. Res.* **4**, 439—461 (1974).
- MALIK, C. P., CHHABRA, N., and VERMANI, S.: Cyclic AMP-induced elongation of pollen tubes in *Tradescantia paludosa*. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **169**, 311—315 (1976).
- MARRIOTT, K. M., and NORTHCOTE, D. H.: The influence of abscisic acid, adenosine 3',5'-cyclic phosphate, and gibberellic acid on the induction of isocitrate lyase activity in the endosperm of germinating castor bean seeds. *J. exp. Bot.* **28**, 219—224 (1977).
- MÜLLER, E.: Zyklus-AMP als Signalüberträger in biologischen Systemen. Teil II: Gibt es eine Signalübertragungsfunktion von zyklus-AMP bei höheren Pflanzen? *Biol. Rundsch.* **11**, 352—361 (1973).
- NANDA, K. K., and SHARMA, R.: Effects of gibberellic acid and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate on the flowering of *Eschscholtzia californica* Cham., a qualitative long day plant. *Plant Cell Physiol.* **17**, 1093—1096 (1976).
- KUMAR, S., and SOOD, V.: Effect of adenosine monophosphates on the flowering of *Impatiens balsamina* L., a qualitative short-day plant. *Planta* **130**, 93—94 (1976).
- NICKELLS, M. W., SCHAEFER, G. M., and GALSKEY, A. G.: The action of cyclic-AMP on GA₃ controlled responses. I. Induction of barley endosperm protease and acid phosphatase activity by cyclic-3',5'-adenosine monophosphate. *Plant Cell Physiol.* **12**, 717—725 (1971).
- NOBEL, P. S.: A rapid technique for isolating chloroplasts with high rates of endogenous phosphorylation. *Plant Physiol.* **42**, 1389—1394 (1967).
- POHL, P., GLASL, H., und WAGNER, H.: Zur Analytik pflanzlicher Glyko- und Phospholipide und ihrer Fettsäuren. *J. Chromatogr.* **49**, 488—492 (1970).
- POTRYKUS, I., and DURAND, J.: Callus formation from single protoplasts of *Petunia*. *Nature, New Biol.* **237**, 286—287 (1972).
- ROBINSON, S. P., and WISKICH, J. T.: Stimulation of carbon dioxide fixation in isolated pea chloroplasts by catalytic amounts of adenine nucleotides. *Plant Physiol.* **58**, 156—162 (1976).
- RUTHEFORD, B., JENKINS, J., ZORICH, N., and GALSKEY, A.: The possible involvement of adenyl cyclase and cyclic-AMP phosphodiesterase in the formation of crown-gall tumors on the primary leaves of Pinto beans. *Plant Cell Physiol.* **17**, 1111—1118 (1976).
- SACHAR, R. G., TANEJA, S. R., and SACHAR, K.: Cyclic AMP — its biological role in higher plants. *J. Sci. Ind. Res.* **34**, 54—64 (1975).
- SCHRAUDOLF, H.: Wirkung von Mononucleotiden auf gibberellinbedingte Morphogenesevorgänge in *Anemia phyllitidis*. *Hoppe-Seyler's Z. phys. Chem.* **353**, 755 (1972).
- Wirkungen von cyclischem 3',5'-AMP, Mononucleotiden und Theophyllin auf Antheridienbildung und Dunkelkeimung von *Anemia phyllitidis* L. Sw. *Z. Pflanzenphysiol.* **84**, 49—59 (1977).
- SCHWEIZER, J., ALLMENDINGER, M., and KULL, U.: Cytokinin stimulation of lipid synthesis in leaves. *Plant Physiol.* **59**, Suppl., 75 (1977).
- SMELTZER, R. H., and JOHNSON, M. A.: Evidence for the presence of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and its metabolism in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) callus. *Canad. J. Forest Res.* **7**, 68—75 (1977).
- TARANTOWICZ-MAREK, E., and KLECZKOWSKI, K.: Effect of cAMP on the pattern of RNA synthesis in protoplasts isolated from gibberellin-sensitive maize seedlings. *Plant Sci. Lett.* **5**, 417—423 (1975).
- TRUELSEN, T. A., DE LANGHE, E., and VERBEEK-WYNDAELE, R.: Cyclic AMP induced growth promotion in sunflower callus tissue. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **82**, 109—114 (1974).
- WELLBURN, A. R., and HAMPP, R.: Fluxes of gibberellic and abscisic acids, together with that of adenosine 3',5'-cyclic phosphate, across plastid envelopes during development. *Planta* **131**, 95—96 (1976).

- WIEDMAIER, J.: Über den Einfluß von cyclischem Adenosinmonophosphat auf den Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel in grünen Blättern. Diss., Univ. Stuttgart 1976.
- and KULL, U.: Evidence of cyclic-AMP uptake into plant cells. *Naturwissenschaften*. **63**, 147 (1976).
- WOOD, H. N., LIN, M. C., and BRAUN, A. C.: The inhibition of plant and animal adenosine 3':5'-cyclic monophosphate phosphodiesterases by a cell-division promoting substance from tissues of higher plant species. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 403—406 (1972).
- and BRAUN, A. C.: 8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate as a promoter of cell division in excised tobacco pith parenchyma tissue. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 447—450 (1973).
- YUNGHANS, W. N., and MORRE, D. J.: Adenylate cyclase activity not found in soybean hypocotyl and onion meristem. *Plant Physiol.* **60**, 144—149 (1977).

Eingegangen am 25. Oktober 1977.

Anschrift der Verfasser: Dr. J. WIEDMAIER, Prof. Dr. U. KULL, Biologisches Institut der Universität Stuttgart, Ulmer Straße 227, D - 7000 Stuttgart 60.