

Ascorbinsäure-Radikale als Indikator für Waldschäden – EPR-spektroskopische Untersuchungen an Fichtennadeln *in vivo*

Ascorbic Acid Radicals as Indicator of Damage to Forest –
EPR Investigations of Spruce Needles *in vivo*

Hartmut B. Stegmann, Paul Schuler

Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 18,
D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

und

Hans-J. Ruff

Forstdirektion Tübingen, Schloß Bebenhausen,
D-7400 Bebenhausen bei Tübingen, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **45c**, 9–12 (1990); received July 18, 1989

EPR *in vivo*, Damage to Forest, Ascorbic Acid Radical

EPR investigations of spruce needles under *in vivo* conditions are capable of detection of several radicals attributed to the plant photosystem. Difference spectra light minus dark are applied in order to discriminate the dark signals in favor of the light-induced spectra. These spectra at 293 K normally consist of a single line which can be attributed to the well-known photosignal I observed with chloroplast or chloroplast fragments. However, inspection of needles grown in a heavily damaged area exhibit additional absorptions. Spectra of this type may be observed as well after treatment of spruce needles or foliage with herbicides. Based on the *g*-value and the coupling constants observed, the new lines can be assigned to the ascorbic acid radical, which is formed by interaction of the plant antioxidative system with oxidizing agents.

Die Primärprozesse bei der pflanzlichen Photosynthese bestehen darin, daß unter Einwirkung von sichtbarem Licht Elektronen des Wassers zur Reduktion von NADP⁺ benutzt werden, wobei Sauerstoff freigesetzt wird. An dieser Elektronentransportkette sind zahlreiche paramagnetische Verbindungen beteiligt. Im wesentlichen handelt es sich dabei um Ionenradikale des Chlorophylls, Semichinone und Schwermetallkomplexe [1]. Aus diesem Grunde sind EPR- und ENDOR-Spektroskopie [2] wichtige Methoden, um derartige Prozesse zu studieren. Wenn auch bis heute bei weitem nicht alle Fragen der Photosynthese geklärt sind, so erlaubt der heutige Kenntnisstand doch, EPR-Untersuchungen durchzuführen, um den Einfluß von anthropogenen Schadstoffen nachzuweisen [3]. Dabei waren die früher beschriebenen Untersuchungen auf Pflanzen mit geringen Mn²⁺-Konzentrationen beschränkt, weil das 6-Linien-Signal des Mn²⁺ alle anderen Absorptionen im *g* = 2,00-

Gebiet überlagert. Über die Bedeutung der Konzentration dieses 2-wertigen Kations in Fichtennadeln wurde kürzlich berichtet [4]. Um Proben unabhängig von dem Mn-Gehalt in die Untersuchungen einbeziehen zu können, haben wir Differenz-Spektren aufgenommen [5], die es gestatteten, sowohl das Photosignal I [6] als auch bei tieferen Temperaturen das „multiline“ Mn-Signal zu beobachten.

Experimenteller Teil

Als Untersuchungsgut wurden entweder 5–10 Fichtennadeln, die der unmittelbar vorangegangenen Wachstumsperiode angehörten, oder *ca.* 2 cm² große Blattfragmente von Eichen, Buchen oder Birken verwendet. Alle untersuchten Proben waren nach visuellen Kriterien absolut ungeschädigt. Ihre bei Raumtemperatur aufgenommenen Differenz-Spektren zeigten je nach Ursprung entweder eine Einzellinie mit einer Linienbreite von 8 G und einem *g*-Faktor von 2,0023, entsprechend dem lange bekannten Photosignal I, oder ein Spektrum, das aus drei Linien unterschiedlicher Intensität besteht. Für die EPR-Messungen wurde ein Varian-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Hartmut B. Stegmann.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341–0382/90/0100-0009 \$ 01.30/0

E-line-X-Band-Spektrometer in Verbindung mit dem Bruker Datensystem ER 140 verwendet. Typische Maschinenparameter: Mikrowellenenergie 5 mW, 10 kHz Feldmodulation, Modulationsamplitude 1 G, gain 4×10^4 , Zeitkonstante 0,128 s, 50 scans unter Verwendung eines FF lock. Für die Belichtung wurde die Schott Kaltlichtquelle K1 1500 verwendet.

Ergebnisse

Proben, die aus einem Hauptschadensgebiet im Forstamt Schluchsee, Region Äulemer Kreuz, stammen [6], zeigen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Entnahme mehr oder weniger starke Veränderungen des Photosignals I. Im wesentlichen wird das Auftreten von zwei neuen Absorptionen bei niedrigem Feld entsprechend den g -Faktoren 2,0056 und 2,0046 beobachtet. Diese Komponenten können die Intensität des Photosignals I übertreffen, so daß sie die Hauptabsorptionen darstellen [5]. Praktisch gleiche Spektren werden an Bäumen beobachtet, deren Standort keinem ausgesprochenen Hauptschadensgebiet zugeordnet worden ist, wie z. B. im Rammert, Kreis Tübingen, wenn entweder langanhaltende Raureif-Depositionen oder Herbizid-Behandlung benachbarter Felder der Probennahme vorausgegangen sind. Im letzteren Fall zeigen auch die Blätter von Laubbäumen völlig vergleichbare lichtinduzierte Spektren. Durch Laboratoriumsversuche, die an kleinen Zweigen in Glaskammern mit entsprechend dotierten Atmosphären durchgeführt wurden, konnte nachgewiesen werden, daß die neuen Signale auf der Tieffeldseite von SI z. B. durch Behandlung mit Herbiziden wie Paraquat oder Domatol® erzeugt werden können (s. Abb. 1). Von der Wirkstoffkombination Domatol® ist 3-Amino-1,2,4-triazol die wesentliche Komponente. Mit zunehmender Einwirkungszeit verstärken sich die neuen Absorptionen in zunehmendem Maße relativ zu dem $g = 2,0023$ -Signal. Bei langanhaltender Belichtung nimmt die Intensität allmählich ab. Systematische Untersuchungen in Abhängigkeit vom Nadelalter wurden bisher nicht durchgeführt. Hell-dunkel-Versuche zeigen eindeutig, daß die neuen Signale photoinduziert sind. Sie haben die gleichen Induktions- und Zerfallszeiten sowie vergleichbare Linienbreiten und zeigen ein einheitliches Sättigungsverhalten, so daß es

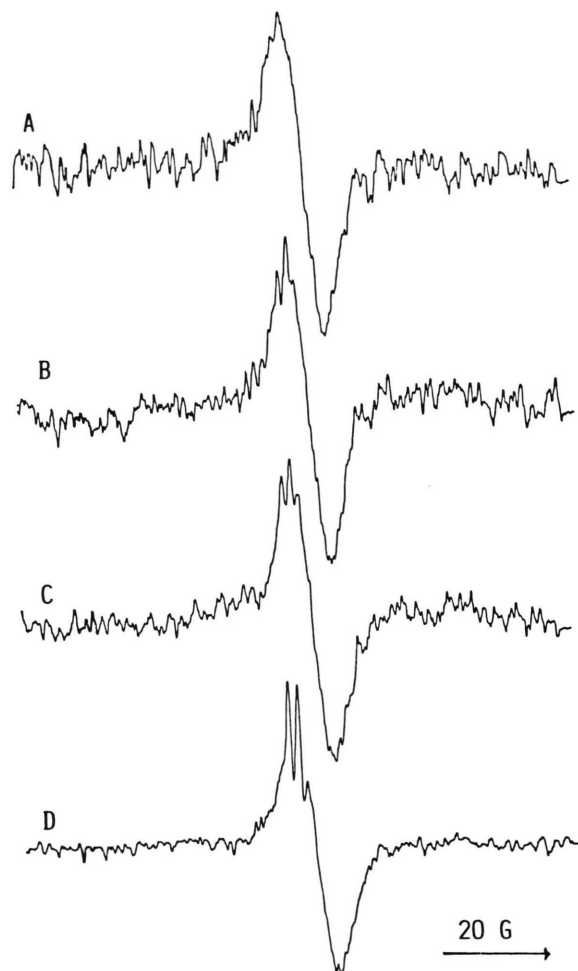


Abb. 1. Differenz-EPR-Spektrum (hell-dunkel) verschiedener Fichtennadeln in der $g = 2,004$ -Region. A, unbehandelte Fichte, Absorption bei $g = 2,0023$; B, Fichte nach Ausbringen von Herbiziden auf benachbarten Feldern, Zusatzabsorptionen bei $g = 2,0056$ und $2,0046$; C, Fichte nach Behandlung mit Domatol®, Freilandversuch; D, Fichtenzweig nach 1 Tag Behandlung mit Paraquat, Laborversuch, verstärkte Absorptionen bei $g = 2,0056$ und $2,0046$.

sich offenbar um das Signal eines einheitlichen Radikals mit Hyperfeinstruktur handelt. Aufnahme der Spektren unter Hochauflösungsbedingungen ergibt das in Abb. 2 dargestellte Dublett von Triplets. Die Kopplungsparameter betragen $a_H^{(1)} = 1,74$ G und $a_H^{(2)} = 0,19$ G, als g -Faktor wurde 2,0051 ermittelt. Diese Daten entsprechen den Werten, die in der Literatur [7] für das freie Ascorbinsäureradikal in wäßrigen Medien angegeben

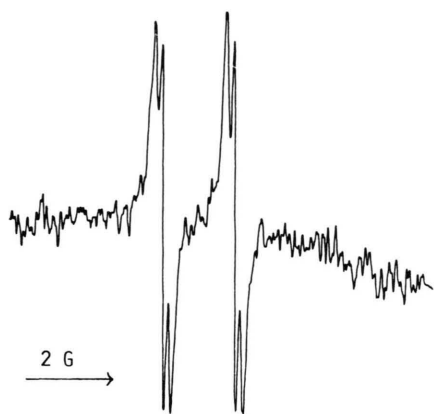


Abb. 2. Differenz-EPR-Spektrum (hell-dunkel) von Fichtennadeln nach Behandlung mit Paraquat unter Hochauflösungsbedingungen.

werden, Komplexbildung mit Kationen [8] oder Veränderung des Solvens [9] bewirken signifikante Änderungen dieser Werte, so daß daraus geschlossen werden muß, daß unter Einfluß der oben erwähnten Substanzen, aber mit Sicherheit auch anderer oxidierender Schadstoffe, eine Störung der photosynthetischen Elektronentransportkette stattfindet, so daß schließlich eine monovalente Oxidation der Ascorbinsäure erfolgt.

Diskussion

Das antioxidative System von Zellen besteht im wesentlichen aus den Vitaminen E und C und Glutathion in Verbindung mit reduzierenden Enzymen wie z. B. Katalase. Das lipidlösliche Vitamin E ist weitgehend in den Membranen lokalisiert und damit immobil. Es ist das primäre Antioxidant, das die Membranen schützt, während das Vitamin C in wäßriger Phase vorliegt und dazu dient, oxidiertes Vitamin E zu reduzieren. Diese Reaktionssequenz unter Beteiligung der entsprechenden Radikale, die durch Einzelelektronenübertragungsreaktion intermediär entstehen, konnte durch EPR-Untersuchungen geeigneter Modelle und durch Bestimmung der Oxidationspotentiale bestätigt werden [10]. Die Abhängigkeit

der Konzentration beider Vitamine in Blättern oder Koniferennadeln von der Einwirkung von Luftschadstoffen wurde mehrfach untersucht [11]. Dabei zeigte sich, daß Schadstoffbelastungen schon in geringen Konzentrationen zu signifikantem Ansteigen der Antioxidationskonzentrationen führt. Offenbar handelt es sich um eine Schutzreaktion, die unter anderem auch für die unterschiedliche Empfindlichkeit von Licht- und Schattenpflanzen gegenüber SO_2 verantwortlich gemacht wird [12]. Diese Ergebnisse wurden durch klassische Analyse, also durch Zerstörung des biologischen Systems, gewonnen, während die hier diskutierten Resultate an intakten Pflanzenorganen, also unter *In-vivo*-Bedingungen, erzielt wurden und die Reaktion der Ascorbinsäure direkt nachweisen. Der eindeutige Nachweis der Tocopherolradikale unter den gleichen Bedingungen ist bisher nicht gelungen. Einerseits dürfte ihre Konzentration gering sein, wenn die Schädigung der Blätter im Anfangsstadium ist und noch genügend Ascorbinsäure vorhanden ist. Andererseits sind für membrangebundene Radikale anisotrop verbreiterte Spektren zu erwarten, die wenig charakteristisch sind; derartige Signale werden tatsächlich bei stark geschädigten Proben beobachtet, aber ihre Zuordnung muß vorerst offenbleiben.

Der Wirkungsmechanismus der Herbicide vom Typ der Viologene ist bekannt [13]. Im ersten Schritt werden diese Verbindungen vom Photosystem I unter Belichtung zu den entsprechenden freien Radikalen reduziert. Diese gehen Redoxreaktionen mit Luftsauerstoff unter Bildung von O_2^- ein, das schließlich zum Wasserstoffperoxid weiterreduziert werden kann. Da beide Verbindungen außerordentlich toxisch für die Zellen sind, haben die Pflanzen ein entsprechendes antioxidatives System entwickelt, dessen Reaktion von uns beobachtet werden kann. Selbstverständlich ist die Beobachtung von Ascorbinsäureradikalen nicht auf die Erzeugung von Superoxidradikalen über die Viologenreaktion beschränkt, sondern ist ganz allgemein ein Indikator für die Einwirkung oxidierender Agentien auf die Photosyntheseorgane.

- [1] J. Ames, Photosynthesis, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford 1987.
- [2] K. Möbius und W. Lubitz, Biological Magnetic Resonance, **Vol. 7**, S. 129–146, Plenum Press, New York 1987.
- [3] H. B. Stegmann, H.-J. Ruff und K. Scheffler, Angew. Chem. **97**, 407 (1985); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **24**, 425 (1985).
- [4] P. Laggner, R. Mandl, A. Schuster, M. Zechner und D. Grill, Angew. Chem. **100**, 1790 (1988); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **27**, 1722 (1988).
- [5] H. B. Stegmann, P. Schuler und H.-J. Ruff, Photochem. Photobiol. (1989), im Druck.
- [6] H. B. Stegmann, P. Schuler und H.-J. Ruff, Allgemeine Forst-Zeitschrift **5**, 120 (1989).
- [7] G. P. Laroff, R. W. Fessenden und R. H. Schuler, J. Am. Chem. Soc. **94**, 9062 (1972).
- [8] H. B. Stegmann, K. Scheffler und P. Schuler, Angew. Chem. **90**, 392 (1978); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **17**, 365 (1978).
- [9] S. Steenken und G. Olbrich, Photochem. Photobiol. **18**, 43 (1973).
- [10] P. Lambelet, F. Saucy und J. Löliger, Experientia **41**, 1384 (1985).
- [11] B. F. Finckh und K. J. Kunert, J. Agric. Food Chem. **33**, 574 (1985); M. Mehlhorn, G. Seufert, A. Schmidt und K. J. Kunert, Plant Physiol. **82**, 336 (1986); K. J. Kunert und G. Hofer, Allgemeine Forst-Zeitschrift **27/28/29**, 697 (1987).
- [12] Th. Keller und H. Schwager, Europ. J. Forest Pathol. **7**, 338 (1977).
- [13] B. Baldwin, Progress in Photosynthesis Research, **Vol. III**, 1737 (1969).