

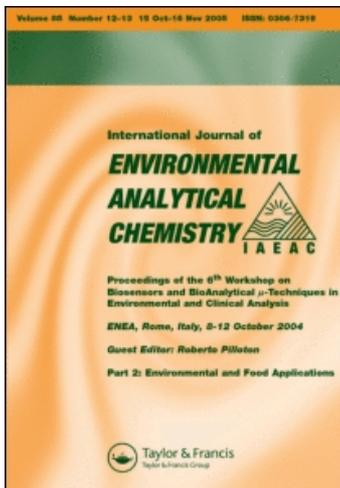
This article was downloaded by:

On: 19 January 2011

Access details: *Access Details: Free Access*

Publisher *Taylor & Francis*

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



International Journal of Environmental Analytical Chemistry

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713640455>

Enzymatisch - analytische Untersuchungen zum Adenosinphosphatgehalt SO₂-begaster Erbsen

J. Hoffmann^a; E. Pahlich^a; L. Steubing^a

^a Aus dem Botanischen Institut der Justus Liebig-Universität Giessen, Giessen

To cite this Article Hoffmann, J. , Pahlich, E. and Steubing, L.(1976) 'Enzymatisch - analytische Untersuchungen zum Adenosinphosphatgehalt SO₂-begaster Erbsen', *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 4: 3, 183 – 196

To link to this Article: DOI: 10.1080/03067317608071113

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/03067317608071113>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Enzymatisch - analytische Untersuchungen zum Adenosinphosphatgehalt SO₂-begaster Erbsen

J. HOFFMANN†, E. PAHLICH‡ and L. STEUBING

*Aus dem Botanischen Institut der Justus Liebig-Universität Giessen,
6300 Giessen, MZVG, Wartweg, BRD*

(Received October 21, 1974)

KEY WORDS: Enzymatic analysis, nucleotides, energy charge, SO₂-effect.

An enzymatic method has been elaborated to measure the concentration of the purine nucleotides AMP, ADP and ATP in green plant material. The influence of SO₂ fumigation (0,3 ppm/m³) on the concentration of these nucleotides has been investigated. As compared to the control the concentration of AMP, ADP and ATP is increased by 40% in the fumigated peas. After ten days of treatment the concentration of the nucleotides decreases slowly in the fumigated seedlings and drops far below that of the control when necrotic leaf areas appear. The molar ratio of AMP:ADP:ATP remains constant in fumigated and unfumigated plants over a period of three weeks of culture. Consequently also the energy charge $[\text{ADP} + 2\text{ATP} / 2(\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP})]$ doesn't change. The value of the energy charge is 0,69 and indicates a slightly anabolic situation of the metabolism throughout the time of investigation. Therefore the energy charge is an insufficient criterion to be used as indicator of SO₂ effects on plant metabolism.

Zur Messung der Purinnukleotide AMP, ADP und ATP in Sprossen von *Pisum sativum* ist eine enzymatische Methode ausgearbeitet worden. Der Einfluß von SO₂-Begasung (0,3 ppm/m³) auf die Konzentration der genannten Adenylate wurde ermittelt. Im Vergleich zur Kontrolle sind die Konzentrationen von AMP, ADP und ATP in den begasten Pflanzen um 40% erhöht. Nach 10 Tagen der SO₂-Einwirkung fallen die Konzentrationen der

†Auszug aus einer Dissertation.

‡Sonderdruckanforderungen.

Nukleotide gegenüber der Kontrolle langsam ab und erreichen beim Auftreten nekrotischer Blattanteile ein Minimum. Das molare Verhältnis von ADP:AMP:ATP bleibt über einen Zeitraum von drei Wochen in den Kontrollpflanzen und den begasten Chargen konstant. Somit ändert sich auch die Energieladung $[\text{ADP} + 2\text{ATP}/2(\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP})]$ in dem fraglichen Zeitraum nicht. Der Wert der Energieladung von 0,69 ist ein Hinweis für eine anabole Gesamtsituation des Stoffwechsels. Die Energieladung ist kein geeignetes Kriterium, um als Indikator für SO_2 -bedingte Veränderungen des Stoffwechsels herangezogen zu werden.

EINLEITUNG

Die Beeinträchtigung physiologischer Abläufe in Pflanzen durch Schwefeldioxid sind vielfältig und reichen von Störungen der Stomafunktion¹ über Veränderungen der photosynthetischen CO_2 -Fixierung² und Beeinträchtigung der Membranfunktionen³ bis hin zu Modifizierungen der katalytischen und regulatorischen Eigenschaften von Enzymproteinen⁴⁻⁷. Dieses weitgestreute Spektrum der SO_2 -Wirkung macht deutlich, daß das Schadgas als ausgesprochen unspezifischer Effektor betrachtet werden muß. Wegen der spezifischen Art der Aufnahme des SO_2 über die Stomata und die dann ablaufenden physikalischen und chemischen Vorgänge der Lösung, Verteilung und Metabolisierung des Moleküls und seiner Folgeprodukte ist eine kausale Voraussage der zu erwartenden Effekte im Sinne eines Mechanismus-Modells schwierig, wenn nicht gar unmöglich.⁸ Trotzdem bleibt die Suche nach Kriterien wünschenswert, die eine Beurteilung der physiologischen Gesamtsituation nach SO_2 -Einfluß erlauben (besonders auch für diagnostische Zwecke).

In der vorliegenden Untersuchung sollte geprüft werden, ob SO_2 -Effekte auch an Regelsystemen zu erkennen sind, die in der Steuerung des Zellstoffwechsels eine übergeordnete Stellung einnehmen. Ein derartiges System ist das Adenylatsystem, das in der von Atkinson⁹ formulierten Weise der "Adenylate Energy Charge" einen Index zur Beurteilung der energetischen Gesamtsituation der Zelle darstellt. Die Energy Charge errechnet sich nach der aufgeführten Formel aus den Konzentrationen der drei Adenylate AMP, ADP und ATP:

$$(\text{ADP}) + 2(\text{ATP})/2((\text{AMP}) + (\text{ADP}) + (\text{ATP})).$$

Nach Atkinson⁹ sind bei hohen Konzentrationen an ATP (im Verhältnis zu ADP und AMP) anabole, also energieverbrauchende Stoffwechselsequenzen gefördert (z.B. Aminosäuresynthese), während bei niedrigen Konzentrationen an ATP katabole, also energieliefernde Prozesse (z.B. Citratzyklus) forciert werden. Inzwischen ist die Wirksamkeit dieses Regulatorsystems durch eine ganze Reihe von Befunden bestätigt worden (für ATP-regenerierende Systeme: Shen *et al.*,¹⁰ Hansford,¹¹ für ATP-verbrauchende

Systeme; Atkinson und Fall¹², Atkinson und Walton,¹³ Klungsöyr *et al.*,¹⁴ Shen und Atkinson,¹⁵ Miller und Atkinson¹⁶). Da SO₂ sowohl fördernd als auch hemmend auf das Wachstum der Pflanzen wirken kann, ist zu vermuten, daß die jeweilige Situation der Ausdruck einer Veränderung des Verhältnisses von anabolen zu katabolen Stoffwechselfvorgängen ist. Dies sollte sich auch in Veränderungen der Energy Charge niederschlagen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die vorliegenden Untersuchungen durchgeführt.

MATERIAL UND METHODEN

Anzucht des pflanzenmaterials und begasung der erbsenkulturen

Als Untersuchungsobjekt für die zu beschreibenden Versuche dienten Erbsen (*Pisum sativum* var. Späths Violetta). Für die Begasungsexperimente wurden die in Chlorwasser oberflächensterilisierten Erbsensamen drei Tage in feuchtem Vermiculite vorgekeimt und dann in Hydrokultur genommen. Als Kulturmedium diente eine Nährlösung nach Knop.¹⁷ Die Keimlinge wurden über einen Zeitraum von drei Wochen unter kontrollierten Bedingungen in Klimaschränken bei 25°C und 80% Luftfeuchtigkeit im 16-Stundentag gehalten.¹⁸ Die Atmosphäre für die Begasungsexperimente enthielt 0,3 ppm (0,9 mg/m³) SO₂. In regelmäßigen Abständen wurden Pflanzenproben entnommen und auf ihren Adenylatgehalt hin untersucht.

Aufbereitung der pflanzen

Der Aufschluß des Pflanzenmaterials erfolgte nach einer modifizierten Methode von Stewart und Guinn.²⁰ Die zwei Stunden nach "Tagesbeginn" geernteten grünen Erbsensprosse (ca. 3g) wurden rasch gewogen und danach sofort in 15 ml kochendem Triäthanolamin-Puffer (0,1 M; pH 7,6) drei Minuten lang mazeriert. Nach schnellem Abkühlen folgte dann die Homogenisation der Pflanzen (Virtis-Homogenisator, 40 sec bei Stufe "high", dies entspricht ca. 45 000 U/min). Das Homogenat wurde bei 2500 U/min zentrifugiert, das Sediment nochmals mit 5 ml Puffer gewaschen und die vereinigten Überstände auf 20 ml aufgefüllt. Dieser Pflanzenextrakt diente

Abkürzungen: ADP Adenosindiphosphat, AMP Adenosinmonophosphat, ATP Adenosintriphosphat, EDTA Äthylendiamintetraessigsäure, GAPDH Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, GTP Guanosintriphosphat, ITP Inosintriphosphat, LDH Lactatdehydrogenase, MK Myokinase, NAD⁺ Nikotinsäureamidnukleotid (oxidierte Form), NADH Nikotinsäureamidnukleotid (reduzierte Form), PEP Phosphoenolpyruvat, PGK Phosphoglyceratkinase, P_i Phosphatrest (anorganisch), PK Pyruvatkinase, UTP Uridintriphosphat.

direkt zur Messung der Adenylate. Wiederholtes Waschen des Sedimentes lieferte nur noch insgesamt 2–5% der bereits extrahierten Adenylate und unterblieb deshalb.

Bestimmung der adenylatgehalte

Die Bestimmung der Adenylate wurde mit einer modifizierten Methode nach Jaworek *et al.*,²¹ enzymatisch vorgenommen. Dazu wurden AMP und ADP zunächst quantitativ in ATP überführt (siehe Gl. (1) und (2)) und das gebildete Pyruvat im optischen Test quantitativ ermittelt (Gl. (3)):

- 1) $\text{AMP} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{MK}} 2 \text{ADP}$
- 2) $\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$
- 3) $\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}^+$

Die ATP-Bestimmung erfolgte ebenfalls in gekoppelter Reaktion (Gl. (4) und (5)):

- 4) $\text{ATP} + \text{Glycerat-3-P} \xrightarrow{\text{PGK}} \text{ADP} + \text{Glycerat-1,3-P}_2$
- 5) $\text{Glycerat-1,3-P}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{GAPDH}} \text{Glycerinaldehyd-P} + \text{NAD}^+ + \text{P}_i$

Die Ansätze zur Bestimmung von AMP und ADP enthielten:

2,0 ml Triäthanolamin-Puffer (0,1 M; pH 7,6),
 0,15 ml PEP (0,01 M PEP; 1,2 M KCl; 0,4 M MgSO₄),
 0,05 ml NADH (0,014 M),
 0,1 ml ATP (0,02 M),
 0,1 ml KCN (0,1 M) und
 0,2 ml des aufgearbeiteten Pflanzenextraktes
 (3 ml Gesamtvolumen des Testansatzes).

Jeweils fünf Minuten nach Zugabe der Enzyme LDH (1,7 µg Enzymprotein/Küvette), PK (1,3 µg) und MK (1,7 µg) sind die Reaktionen abgelaufen, und aus den Extinktionsdifferenzen können die Adenylate berechnet werden (siehe unten).

Die Ansätze zur Bestimmung des ATP enthielten:

2,25 ml Puffer-Substrat-Lösung (0,1 M Triäthanolamin-Puffer; 0,01 M Mg SO₄; 0,01 M Glycerat-3-P als Ba-Salz (Ba als BaSO₄ ausgefällt); 0,001 M EDTA; auf pH 7,6 eingestellt)
 0,05 ml NADH (0,014 M)
 0,1 ml KCN (0,1 M) und
 0,2 ml des aufgearbeiteten Pflanzenextraktes.
 Jeweils fünf Minuten nach Zugabe der Enzyme GAPDH (6,7 µg Enzym-

protein/Küvette) und PGK (1,3 μg) wurden die Extinktionen ermittelt.

Die Berechnung der Konzentrationen der Adenylate erfolgte nach folgender Beziehung:

$$\Delta\text{Ext}_{\text{AMP}} \times F \times 0,79 = \text{mg AMP/Sproß}$$

$$\Delta\text{Ext}_{\text{ADP}} \times F \times 1,94 = \text{mg ADP/Sproß}$$

$$\Delta\text{Ext}_{\text{ATP}} \times F \times 2,31 = \text{ATP/Sproß}$$

F = ml Gesamtvolumen des Pflanzenextraktes/Anzahl der Pflanzen. Die aus Eichkurven ermittelten Umrechnungsfaktoren gelten für 0,2 ml Pflanzenextrakt pro Ansatz.

Zur Frage der Bezugseinheit ist zu erwähnen, daß Frischgewicht, Trockengewicht, Proteingehalt, Stickstoffgehalt usw. im Begasungsexperiment selbst Variable darstellen.²²⁻²⁴ Der absolute Gehalt an Adenylaten in Pflanzen ist nur vergleichbar, wenn er auf konstante Größen wie definierte Blattflächen oder ganze Pflanzenorgane bezogen wird. Deshalb wurden die nach der obigen Methode erhaltenen Werte für AMP, ADP und ATP in den begasten und unbegasten Erbsenkeimlingen pro Sproß berechnet.

Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Meßreihen. Durch eine Varianzanalyse nach Rauen²⁵ wurde die Signifikanz der Meßwerte überprüft. Diese statistische Methode bietet den Vorteil, daß sie nicht nur die Werte der begasten und der Kontrollchargen, sondern auch die Werte in verschiedenen Altersstadien miteinander vergleicht und dadurch die Streuung im biologischen Material stärker berücksichtigt.

TABLE I

Absicherung der Meßmethode durch Zusatz bekannter Mengen an Adenylaten (Konzentration: 0,1 mg/ml) zum Pflanzenextrakt (Werte als Extinktionsdifferenzen angegeben).

Testansatz	0,2 ml Pflanzenextrakt	0,1 ml Adenylatlösung	0,1 ml Adenylatlg. + 0,2 ml Pfl.-Extrakt	% Wiederfindung
ATP	0,035	0,017	0,052	100
ADP	0,025	0,018	0,042	98
AMP	0,010	0,042	0,051	98

Geräte und Chemikalien

Die enzymatischen Bestimmungen der Adenylatgehalte in den Pflanzenextrakten erfolgten in einem registrierenden Riele-Filterphotometer (UPHO) bei 366 nm.

Die Chemikalien für die Adenylatbestimmung, die Enzyme in Ammoniumsulfat-Suspension, die Coenzyme und Adenylate wurden von Boehringer (Mannheim) bezogen.

ERGEBNISSE

Wiederfindungsexperimente

Um sicherzustellen, daß die beschriebene Methodik durch extraktbedingte Störfaktoren nicht beeinträchtigt wird, wurden bekannte Mengen an Adenylaten den Pflanzenextrakten zugesetzt und anschließend zurückbestimmt.

Wie aus Table I hervorgeht, sind die Adenylatmengen im Pflanzenextrakt und in den entsprechenden Testgemischen additiv (Spalte 3), die Wiederfindung beträgt praktisch 100%. Im Bereich von 0–1 mg/ml Adenylat herrscht zwischen Konzentration und Extinktion eine lineare Beziehung.

Um Störeffekte durch die Triphosphate ITP, GTP und UTP auszuschließen, von denen bekannt ist, daß sie zu hohe ATP-Werte vortäuschen können,²¹ wurden zusätzliche Experimente unternommen. Nach Zusatz von MK, die nur Adenylate umsetzen kann,^{26, 27} konnten keine meßbaren Mengen der genannten Triphosphate festgestellt werden.

Eine als Leerschleim störend wirkende NADH-Oxidase wurde durch Cyanid-Zusatz vollständig gehemmt.

Da bekannt ist, daß die Konzentrationen von Adenylaten in Geweben kurzfristig erhebliche Veränderungen erfahren können, die auch von der Aufarbeitungsdauer des Analysenmaterials abhängig ist,²⁸ wurden zunächst verschiedene Aufschlußverfahren verglichen (Tab. II).

Aus der Tabelle geht folgendes hervor:

1) In hitzgetrocknetem Pflanzenmaterial (*a*) sind sehr hohe Werte für ADP und AMP nachweisbar, die vermutlich durch artefizielle Veränderungen im Pflanzengewebe während des Trocknungsprozesses verursacht werden.

2) Wurden die Sprosse rasch in eiskaltem Puffer verarbeitet (*b*) so konnten die Adenylate wegen des hohen Leerschleims nicht gemessen werden. Die Reaktion war auch nach 30 min noch nicht beendet, einem Zeitintervall, das für derartige Messungen zu lang ist.

3) Nach schnellem Abtöten der Pflanzen im siedenden Puffer oder Wasser (*c*) werden Werte erzielt, die sich erheblich von denen der vorausgehenden Versuche unterscheiden. Da bei dieser Aufarbeitung metabolische Veränderungen ausgeschlossen werden können, ein vorhandener Leerschleim durch Cyanid ausgeschaltet werden kann, entschieden wir uns für diese Methode. Die Ergebnisse sind gut reproduzierbar (was auch Stewart und Guinn²⁰

TABLE II

Vergleich verschiedener Aufarbeitungsmethoden (Zahlen bedeuten Extinktionsdifferenzen). Je 3g Erbsensprosse wurden (a) bei 100°C getrocknet und dann in Puffer homogenisiert, (b) direkt in eiskaltem Puffer homogenisiert, (c) drei Minuten in siedendem Puffer gekocht, abgekühlt und homogenisiert. Weitere Verarbeitung wie in Material und Methoden beschrieben. Es bedeuten: konst.: enzymatische Reaktion war nach fünf Minuten abgeschlossen; Veränd.: Extinktionsdifferenz nimmt auch nach 15 min Reaktionszeit noch zu (+ Extinktionsdifferenz nach 10 min, ++ nach 15 min). (x) MK-Zusatz trotz vorhergehender permanenter Extinktionsänderung.

	(a)	(b)	(c)
ATP	0,020 konst.	0,033 0,037+ 0,040++ veränd.	0,029 konst.
ADP	0,031 konst.	0,024 0,028 0,030 veränd.	0,020 konst.
AMP	0,025 konst.	0,013 (x) 0,015 0,018 veränd.	0,008 konst.

TABLE III

Vergleich gekochter und unbehandelter Adenylatlösungen mit und ohne KCN-Zusatz (Werte als Extinktionsdifferenz angegeben). Gekochte Lösung: 5 ml jeder Lösung wurden 5 min im Wasserbad bei 100°C gekocht, abgekühlt und wieder auf 5 ml mit H₂O aufgefüllt. Adenylatkonzentration: 0,1 mg/ml.

	nicht gekocht		gekocht
	ohne KCN	mit KCN	mit KCN
AMP	0,082	0,082	0,084
ADP	0,036	0,035	0,036
ATP	0,034	0,035	0,034

beobachtet haben). Eine weitere Aufarbeitung des Analysenmaterials erübrigt sich deshalb und erleichtert dadurch Serienmessungen. Zudem konnte mit reinen Lösungen von ATP, ADP und AMP sichergestellt werden, daß die drei Adenylate durch Kurzzeiterhitzung nicht zerstört werden, und daß KCN keinen Einfluß auf die enzymatische Messung hat (Tab. III).

Die beschriebenen Versuche belegen, daß die verwandte Methode zur Bestimmung der Adenylate in Pflanzenextrakten die Gewähr bietet, den tatsächlichen Gehalt dieser Verbindungen zu erfassen.

Veränderung der adenylatgehalte in begasten und unbegasten erbsensprossen

Die Veränderungen der Adenylatgehalte im Verlaufe der Kultur sind in Abb. 1 aufgezeichnet. Unter Kontrollbedingungen steigen die Konzentrationen aller drei Adenylate von Beginn der Hydrokultur bis zum 20. Tag kontinuierlich an. Enthält die Atmosphäre jedoch 0,3 ppm SO₂, so erfahren die Adenylatgehalte zunächst eine Erhöhung gegenüber den Kontrollpflanzen. Bei einsetzender nekrotischer Schädigung (nach dem 15. Tag) fallen sie jedoch drastisch ab und liegen dann unter denen der Kontrollen. Die in diesen Untersuchungen gemessenen Unterschiede in den Adenylatgehalten sind signifikant verschieden (Sicherungsgrenze < 0,1%), wie mit Hilfe der Varianzanalyse für mehrfache Gliederung²⁵ gezeigt werden konnte.

Aus Tabelle IV ist zu entnehmen, daß die begasten Pflanzen nach zehn Tagen ca. 40% mehr Adenosinphosphate enthalten als die Kontrollen. Berechnet man aus den Ergebnissen der Tabelle IV die "Energy Charge",⁹ so ergaben sich für den gesamten Versuchszeitraum Werte, die um 0,69 liegen. Das bedeutet, daß die "Energy Charge" durch die SO₂-Begasung praktisch nicht beeinflußt wird, das Verhältnis der drei Adenylate zueinander, wie es in der Gleichung für die "Energy Charge" beschrieben ist, also nicht verändert wird. Demgegenüber durchlaufen die Quotienten aus den Konzentrationen der Adenylate der Kontrollpflanzen und der begasten Sprosse ein Minimum (K/G in Tab. IV). Die Werte fallen von 1 beim Begasungsbeginn langsam auf etwa 0,7 am zehnten Tag ab und steigen danach wieder an. Parallel dazu nimmt das Frischgewicht der Kontrollpflanzen kontinuierlich zu, während das der SO₂-begasten Pflanzen generell niedriger ist, nach dem zehnten Tag sogar stark abfällt. Der Abfall des Frischgewichtes der begasten Keimlinge vom zehnten Tag der Kultur an wird gefolgt von dem Auftreten nekrotischer Blattanteile.

Der Befund ist ein starkes Indiz dafür, daß nach dem zehnten Kulturtag eine entscheidende Veränderung im Wasserhaushalt der begasten Pflanzen eintritt. Vermutlich ist ein zunehmend negatives Wasserpotential die eigentliche Ursache für die offensichtlich auftretende Umorientierung des Stoff-

TABLE IV

Adenylatgehalte der begasten (G) und unbegasten (K) Erbsensprosse in $\mu\text{g}/\text{Spro\ss}$ (SO_2 -Konzentration: 0,3 ppm). K/G = das Verhältnis der Adenylate in Kontrollpflanzen und begasten Chargen. "Energy Charge" = $\text{ADP} + 2\text{ATP} / 2(\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP})$; Faktoren zur Umrechnung der μg Adenylat in μmol : ATP = 1,97, ADP = 2,34, AMP = 2,88. Aufgearbeitet wurden ca. 3g Pflanzensprosse/Bestimmung. Die Adenylatgehalte wurden aus fünf Meßreihen mit einer Sicherungsgrenze kleiner als 0,1% ermittelt.

	Keiml.		K		G		K		G		K		G		K		G		
Alter (Tage)	0	3	3	7	7	7	10	10	10	10	13	13	13	13	16	16	16	20	20
g Frischgew./Sproß	0,03	0,23	0,20	0,65	0,60	0,89	0,86	1,13	0,80	1,24	0,80	0,75	1,45	0,59					
μg ATP/Sproß % der Kontrolle	6,3	84	109	192	275	238	333	340	398	392	421	421	455	393					
μg ADP/Sproß % der Kontrolle	5,3	64	71	192	237	223	314	291	334	334	423	423	475	343					
μg AMP/Sproß % der Kontrolle	0,8	9	11	20	26	24	35	29	40	36	46	46	49	35					
K/G (ATP)	1,00	0,77	0,70	0,70	0,71	0,85	0,93	1,16											
K/G (ADP)	1,00	0,90	0,81	0,81	0,71	0,87	0,79	1,38											
K/G (AMP)	1,00	0,82	0,77	0,77	0,69	0,72	0,78	1,40											
"Energy Charge"	0,68	0,70	0,72	0,68	0,70	0,69	0,68	0,70	0,70	0,70	0,68	0,70	0,67	0,70	0,68	0,67	0,70	0,70	0,70

wechsels in den begasten Keimlingen. Diese Umorientierung äußert sich darin, daß die einzelnen Adenylate gegenüber der Kontrolle zwar drastische Veränderungen erfahren, die Gesamtbilanz der Adenylat-metabolisierenden Sequenzen, wie sie durch die "Energy Charge" erfaßt wird, aber unverändert bleibt.

DISKUSSION

Vergleicht man das Wuchsverhalten (Frischgewicht) der in diesen Untersuchungen verwendeten Keimlinge der Kontroll- und der begasten Charge, so lassen sich zwei Phasen der SO_2 -Einwirkung feststellen:

a) Bis zum zehnten Tag der Anzucht verläuft die Frischgewichtszunahme bei beiden Chargen identisch.

b) Ab dem zehnten Tag der Anzucht bleibt das Frischgewicht der begasten Pflanzen hinter dem der Kontrollen zurück und nimmt sogar mit zunehmender Begasungsdauer wieder ab.

Wertet man die Konzentrationen der Adenylate als Gradmesser für die Stoffwechselaktivität, ist in den begasten Pflanzen eine Stimulierung zu beobachten, die etwa bis zum 16. Tag der Anzucht anhält. Welche Möglichkeiten der Erklärung für dieses Phänomen bieten sich an?

Es kann als gesichert gelten, daß Modifizierungen der Kulturbedingungen (Licht, Gasstoffwechsel) sofort (Sekunden- bis Minutenbereich) Veränderungen im Gehalt der Adenylate AMP, ADP und ATP nach sich ziehen, also generell ein schneller Umsatz dieser Verbindungen möglich ist.^{29, 30} Bleiben die veränderten Kulturbedingungen längere Zeit bestehen, so stellt sich der Ausgangszustand nach einigen Minuten, bei tieferen Temperaturen erst nach Stunden wieder ein.²⁸ Bei Nichtbeachten dieser Erkenntnis sind also durch die Aufarbeitung bedingte Schwankungen der Adenylate nicht ausgeschlossen. Durch das Aufkochen der gerade geernteten Versuchspflanzen glauben wir, diese Fehlermöglichkeit ausgeschlossen zu haben, sodaß die angegebenen Werte den tatsächlichen Gehalt an AMP, ADP und ATP wiedergeben. Da die Proben immer zur selben Tageszeit geerntet wurden, sind auch Fehler, die durch eine Tagesrhythmik bedingt sein könnten, eliminiert. Die beobachteten Konzentrationserhöhungen der Adenylate sind demnach als direkte Folge der SO_2 -Einwirkung zu interpretieren.

Es erhebt sich nun die Frage, auf welchen Wegen in den Pflanzen die erhöhten Purinnukleotidgehalte erzielt werden. An zwei Möglichkeiten kann man denken. Einmal können durch die Begasung die für die Purinsynthese erforderlichen Metabolitkonzentrationen gesteigert sein, die zu verstärkter Neubildung Veranlassung geben. Zum anderen kann bei gleichbleibender Synthesegeschwindigkeit der Abbau des AMP gehemmt sein. Da alle drei

Adenylate eine Konzentrationserhöhung erfahren, ist nach Bomsel und Pradet²⁹ eine Neusynthese wirksam. Wie die Purinsynthese in höheren Pflanzen jedoch reguliert wird, ist weitgehend unbekannt. In Anlehnung an Untersuchungen an Bakterien und tierische Zellen ist zu vermuten, daß Glutamin, Glycin und Asparaginsäure in der Synthesekette des Purinkörpers eine wichtige Rolle spielen.³¹ Weissman³² konnte zeigen, daß Glutamin und Asparaginsäure in jungen Weizenblättern, die mit Ammonium statt mit Nitrat ernährt wurden, in höheren Konzentrationen zu finden sind. Auch Analysen der Ausscheidungsprodukte der Wurzeln von Sonnenblumen sowie Sojabohnen zeigen eine höhere Konzentration der drei Stickstoffmetaboliten unter den Bedingungen der Ammoniumernährung.^{33, 34} Den direkten Zusammenhang zwischen Ammoniumernährung und Adenylatgehalt konnte Weissman³⁵ schließlich auch nachweisen. In Blättern und Wurzeln von Sojabohnen und Sonnenblumen ist danach der Gesamtgehalt der Adenin-nukleotide auf ammoniumhaltigem Medium um 27–49% höher als in den entsprechenden Nitratkulturen. Es besteht demnach eine direkte Beziehung zwischen Ammoniumernährung der Pflanzen und dem Gehalt an Glutamin, Glycin und Asparaginsäure einerseits und einem gesteigerten Gehalt an Adenylaten andererseits.

Gerade von den genannten Aminosäuren aber ist bekannt, daß sie nach SO₂-Begasung von Erbsenkeimlingen in den Sprossen ansteigen,^{22, 36, 37} woraus auf eine gesteigerte Adenylatsynthese geschlossen werden kann.

Nach längerer Begasungsdauer (14 bis 16 Tage) zeigten die Erbsenpflanzen in einigen Blattregionen irreversible nekrotische Schädigungen. Diese Nekrosen weisen auf einen Zusammenbruch des Stoffwechsels hin. In diesem Stadium ist die Sulfatkonzentration in den Pflanzen stark angestiegen,^{22, 38} jedoch ein Abfall des Gesamtgehaltes an Adenylaten zu beobachten. Dieser Abfall zeichnet sich schon vom zehnten Tag der Begasung an ab, wie aus der relativen Abnahme der Adenylate im Vergleich zur Kontrolle hervorgeht (Tab. 4, K/G). Also scheint zu diesem frühen Zeitpunkt bereits eine Umstimmung im Stoffwechsel zu erfolgen, womit eine Parallelität zwischen der Entwicklung des Frischgewichts und der stoffwechselphysiologischen Situation offensichtlich wird. In diesem Zusammenhang wäre nochmals an eine Veränderung des Wasserpotentials in der Zelle zu denken, die der Anlaß für die generelle Umstimmung im Stoffwechsel sein kann.

Wie diese Umstimmung auf die Adenylatbildung einwirkt, ist nicht untersucht. Die Störungen im Stoffwechsel dürften mit einer Entkopplung der Elektronentransportkette von der zyklischen und der nichtzyklischen Photophosphorylierung in den Chloroplasten und/oder der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien zusammenhängen. Dieser Verdacht wird durch Ergebnisse von Asada *et al.*,³⁹ untermauert, die den Effekt der

Sulfat-, Glyoxalbisulfit und Sulfit-Ionen auf die Photophosphorylierungsaktivität von isolierten Spinatchloroplasten genauer untersucht haben. Im Gegensatz zu NaCl und NaNO₃, die keine Effekte oder aber eine leichte Stimulation bewirken, wurde die ATP-Bildung in der zyklischen und nicht-zyklischen Phosphorylierung durch höhere Konzentrationen der oben genannten Ionen gehemmt. Auf Grund ihrer Befunde wird vermutet, daß Sulfat als Entkoppler wirkt, indem es den Elektronentransport von der Phosphorylierungsreaktion trennt. Allerdings wird im Unterschied zu den üblichen Entkopplern durch höhere Sulfatkonzentrationen die Geschwindigkeit des Elektronenflusses in der Elektronentransportkette nicht beeinträchtigt. Eine ähnliche Situation ergibt sich für die oxidative Phosphorylierung. Ballantyne⁴⁰ konnte zeigen, daß die ATP-Produktion in Mitochondrien von Maiskoleoptilen und Bohnenhypokotylen durch Sulfitonen gehemmt wird. Hasson-Porath und Poljakoff-Mayber⁴¹ beobachteten in Erbsenwurzeln bei steigendem Sulfatgehalt des Nährmediums ebenfalls einen Abfall des ATP-Gehaltes.

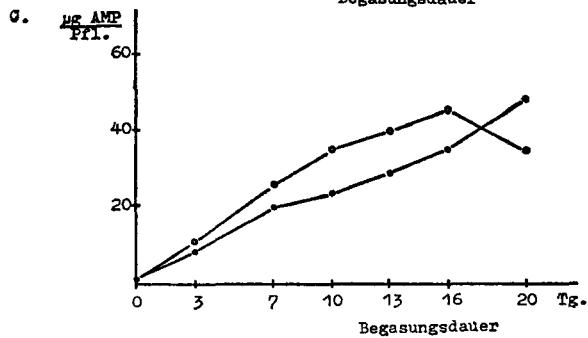
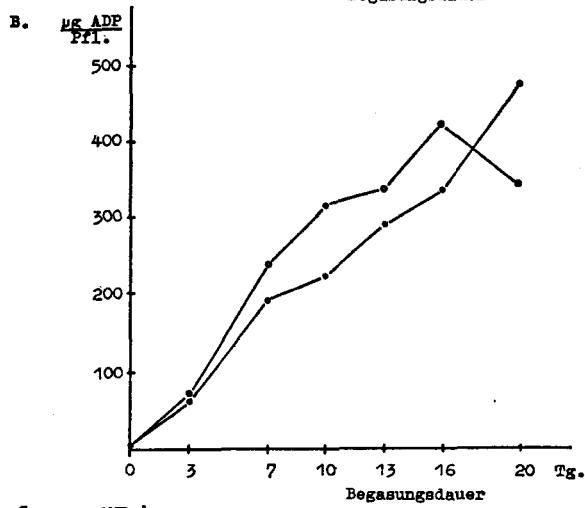
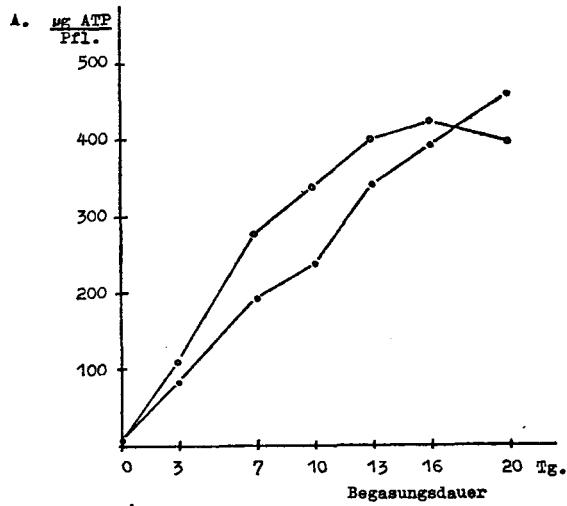
Man muß annehmen, daß eine Entkopplung wirksam wird, die mit Veränderung der Mitochondrienmembran einhergeht, welche durch SO₂, bzw. dessen Folgeprodukte' ausgelöst wird. Das geht aus Untersuchungen von Heber und Santarius⁴² hervor, die gezeigt haben, daß eine durch Glukose verhinderte Entkopplung durch NaCl, MgCl₂ und Na₂SO₄ wieder rückgängig gemacht werden kann. Möglicherweise deuten die erhöhten Glukose- und Fruktose-Gehalte in Erbsen nach SO₂-Begasung auf einen Selbstschutzmechanismus gegen solche Entkopplungsreaktionen hin.³⁶ Da die Konzentrationen solcher schützender Metabolite durch entsprechende Kulturmaßnahmen und insbesondere durch die Nährstoffversorgung der Pflanze gesteuert werden kann, eröffnet sich eine Möglichkeit, durch geeignete Düngung die schädigenden Einflüsse von SO₂-Immissionen auf Pflanzen zu verringern oder hinauszuzögern.⁴³⁻⁴⁵

Von besonderem Interesse ist der Befund, daß sich die "Energy Charge" über den gesamten Versuchszeitraum nicht verändert, die erwartete Umorientierung des Stoffwechsels von anabolen zu katabolen Prozessen also nicht zu beobachten ist. Es ist zu vermuten, daß über die Reaktion der Adenylat-Kinase das Gleichgewicht AMP:ADP:ATP aufrecht erhalten wird. Messungen der Aktivität dieses Enzyms liegen bisher nicht vor. Von der Energiebilanz her können jedenfalls keine SO₂-Effekte registriert werden, was dieses System für diagnostische Zwecke uninteressant erscheinen läßt.

Die Untersuchungen wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Stiftung Volkswagenwerk unterstützt.

Literatur

1. O. Majernik, T. A. Mansfield, *Nature* **227**, 377 (1970).
2. W. Libera, H. Ziegler, I. Ziegler, *Planta* **109**, 269 (1973).
3. U. Lüttge, C. B. Osmond, E. Ball, E. Brinkmann, G. Kinze, *Plant and Cell Physiol.* **13**, 505 (1972).
4. E. Pahlich, *Planta* **100**, 222 (1971).
5. E. Pahlich, H.-J. Jäger, L. Steubing, *Angew. Botan.* **46**, 183 (1972).
6. E. Pahlich, *Planta* **110**, 267 (1973).
7. I. Ziegler, *Planta* **103**, 155 (1972).
8. E. Pahlich, *Atmospheric Environment* **9**, 261 (1975).
9. D. E. Atkinson, *Biochem.* **7**, 4030 (1968).
10. L. C. Shen, L. Fall, G. W. Walton, D. E. Atkinson, *Biochem.* **7**, 4041 (1968).
11. R. G. Hansford, *FEBS-Letters* **21**, 139 (1972).
12. D. E. Atkinson, L. Fall, *J. Biol. Chem.* **242**, 3241 (1967).
13. D. E. Atkinson, G. M. Walton, *J. Biol. Chem.* **242**, 3239 (1967).
14. L. Klungsöyr, J. H. Hageman, L. Fall, D. E. Atkinson, *Biochem.* **7**, 4035 (1968).
15. L. C. Shen, D. E. Atkinson, *J. Biol. Chem.* **245**, 3996 (1970).
16. A. L. Miller, D. E. Atkinson, *Arch. Biochem. Biophys.* **152**, 531 (1972).
17. W. Knop, *Landwirtsch. Vers.-Station* **30**, 292 (1884).
18. H.-J. Jäger, L. Steubing, *Angew. Botan.* **44**, 209 (1970).
19. J. McD. Stewart, G. Guinn, *Pl. Physiol.* **44**, 605 (1969).
20. D. Jaworek, W. Gruber, H.-U. Bergmeyer. In H.-U. Bergmeyer, *Methoden der Enzymatischen Analyse* (Verlag Chemie, Weinheim, 1970), Bd. II, 2020 und 2051.
21. H.-J. Jäger, E. Pahlich, L. Steubing, *Angew. Botan.* **46**, 199 (1972).
22. G. Kahnt, *Angew. Botan.* **34**, 222 (1966).
23. D. J. W. Lee, I. Reaper, *The Internat. J. Biochem.* **3**, 73 (1972).
24. H. M. Rauen. In: H. M. Rauen, *Biochemisches Taschenbuch* (Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1964, 2. Aufl.), II. Teil, 1004.
25. F. J. Ballard, *Biochem J.* **117**, 231 (1970).
26. W. Gruber, H. Möllering, H.-U. Bergmeyer. In: H.-U. Bergmeyer, *Methoden der Enzymatischen Analyse* (Verlag Chemie, Weinheim, 1970), Bd. II, 2010.
27. A. Lewenstein, R. Bachofen, *Biochem. Biophys. Acta* **267**, 80 (1972).
28. J. L. Bomsel, A. Pradet, *Physiologie Végétale* **5**, 223 (1967).
29. W. Simonis, W. Urbach, *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**, 89 (1973).
30. J. M. Buchanan, S. C. Hartman, *Advances in Enzymology* **21**, 199 (1959).
31. G. S. Weissman, *Amer. J. Bot.* **46**, 339 (1959).
32. G. S. Weissman, *Pl. Physiol.* **39**, 947 (1964).
33. G. S. Weissman, *Pl. Physiol.* **49**, 138 (1972).
34. G. S. Weissman, *Pl. Physiol.* **49**, 142 (1972).
35. J. Kostir, J. Machackova, V. Jiracek, E. Buchar, *Experientia* **26**, 604 (1970).
36. U. Arndt, *Staub* **30**, 256 (1970).
37. R. Guderian, *Z. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **77**, 201–399 (1970).
38. K. Asada, S. Kitoh, R. Deura, Z. Kasai, *Plant and Cell Physiol.* **6**, 615 (1965).
39. D. J. Ballantyne, *Photochem.* **12**, 1207 (1973).
40. E. Hasson-Porath, A. Poljakoff-Mayber, *Pl. Physiol.* **47**, 109 (1971).
41. U. Heber, K. A. Santarius, *Pl. Physiol.* **39**, 712 (1964).
42. I. A. Leone, E. Brennan, *J. Air Poll. Contr. Assoc.* **22**, 544 (1972).
43. J. Materna, R. Kohout, *Naturwissenschaften* **54**, 351 (1967).
44. W. W. Heck, J. A. Dunning, I. J. Hindawi, *J. Air Poll. Contr. Assoc.* **15**, 511 (1965).



Adenylatgehalte der unbegasten (●—●) und der mit 0,3 ppm SO_2 begasten (○—○) Erbsensprosse im Verlaufe der ersten drei Wochen der Entwicklung in $\mu\text{g/Sproß}$. A: ATP, B: ADP, C: AMP. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Bestimmungen.