

# Veränderungen der Pigment- und Prenylchinongehalte in Chloroplasten von Gerstenkeimlingen nach Applikation des Wuchsstoffherbizids MCPA (4-Chlor-2-methylphenoxyessigsäure)

Changes of the Amounts of Pigments and Prenylquinones in Chloroplasts of *Hordeum vulgare* – Seedlings Treated with the Growth Regulating Herbicide MCPA (4-Chloro-2-methylphenoxyacetic Acid)

H. K. Kleudgen

Botanisches Institut, Universität Karlsruhe

Z. Naturforsch. **34 c**, 106–109 (1979) ; eingegangen am 13. November 1978

Growth-Regulator, Prenyllipids, Chloroplasts, Senescence

MCPA (4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid) was applied (1, 10, 100  $\mu\text{M}$ /l) via the roots to 4 day old etiolated barley seedlings, which were subjected to continuous white light at the same time. The prenyllipids of chloroplasts (chlorophylls, carotenoids, prenylquinones) were determined 7 and 10 days after sowing.

Chlorophyll accumulation was reduced by up to 40% compared to the control depending on the herbicide concentration. The formation of carotenoids was inhibited to a lower degree, the ratio xanthophylls/carotenes being increased. There were decreasing ratios of chlorophyll a/benzoquinones and a higher inhibition of the oxidized benzoquinones plastoquinone-9 and  $\alpha$ -tocopherol compared to the reduced forms plastohydroquinone-9 and  $\alpha$ -tocopherol.

Very similar changes had been observed in earlier works on barley seedlings undergoing an artificial degeneration of their chloroplasts in the dark. It is suggested that MCPA induces a state of senescence in the prenyllipid metabolism of the photosynthetic apparatus, which is correlated with respect to structure, to a reduction of the pigment antennae.

## Einleitung

Das Herbizid MCPA ist dem 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) strukturell sehr ähnlich. Die Analogie im Aufbau dieser Phenoxyessigsäuren zur IES (Indol-3-essigsäure) legt eine mögliche Interaktion dieser Herbizide mit der endogenen IES nahe. Faktorenanalytische Untersuchungen haben nachgewiesen, daß 2,4-D und IES bei der Auslösung von Wachstumsreaktionen an der gleichen Stelle des physiologischen Reaktionsgeschehens wirksam werden können [1]. Wahrscheinlich deshalb führt die Applikation von Phenoxyessigsäuren zu einer Störung des hormonellen Gleichgewichts zugunsten der Auxine [2].

Ihre Wirkung wurde als die Induzierung eines Seneszenzprozesses verstanden, ausgelöst durch überoptimale Auxinversorgung [3]. Es soll im folgenden untersucht werden, in welcher Weise der Stoffwechsel der Prenyllipide in den Chloroplasten durch Applikation von MCPA verändert wird und ob sich solche Veränderungen in ähnlicher Weise deuten lassen.

## Material und Methoden

Gerste, *Hordeum vulgare* L. („Breuns Villa“) wurde 4 Tage im Dunkeln (22 °C, 80% r.F.) auf Aqua dest. angezogen. Zu Beginn des 5. Tages wurden die Pflanzen in einen Lichtthermostaten gebracht (Fluora-Leuchten, 800  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , 80% r.F.). Zur gleichen Zeit wurde auf 10% von der Crone Nährlösung umgesetzt, die das Herbizid in methanolischer Lösung (0,5% Methanol von der Gesamtlösung) enthielt. Die Ernte erfolgte 7 Tage (10, 100  $\mu\text{M}$  MCPA) und 10 Tage (1, 10, 100  $\mu\text{M}$  MCPA) nach Aussaat. Die Bestimmung der Prenyllipide erfolgte nach Extraktion in Aceton + Petrolbenzin spektralphotometrisch (Chlorophylle [4]) und dünnschichtchromatographisch (Carotinoide [5], Prenylchinone [6]). Die Standardabweichung der Prenyllipidwerte beträgt im Mittel ca.  $\pm 8\%$ .

Die Chloroplasten wurden in einem Puffer mit Tris/HCl (0,05 M, pH 8), 0,2 M Saccharose, 0,01 M NaCl und 0,005 M  $\text{MgCl}_2$  isoliert. Die Bestimmung der Hill-Aktivität erfolgte am Spektralphotometer mit Dichlorphenolindophenol (33  $\mu\text{M}$ ).

## Ergebnisse

Die Chlorophyllgehalte gehen – mit Alter der Pflanzen und Konzentration zunehmend – zurück

Sonderdruckanforderungen an Dr. H. K. Kleudgen, Botanisches Institut der Universität Karlsruhe, Kaiserstraße 12, D-7500 Karlsruhe.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

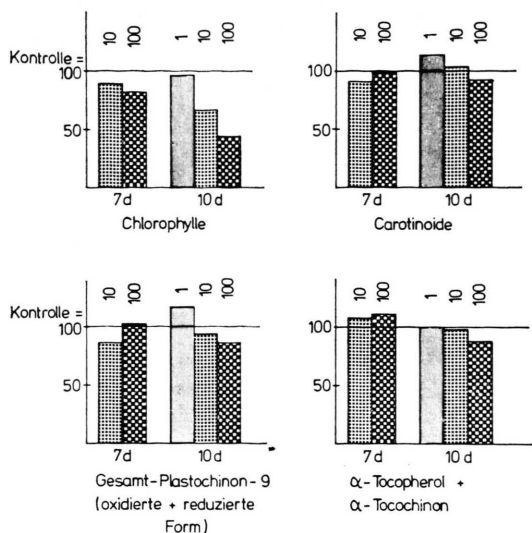


Abb. 1. Einfluß von MCPA auf die Gehalte an Pigmenten und Prenylchinonen bei belichteten *Hordeum*-Keimlingen. Kontrolle=100%. Die jeweilige Herbizidkonzentration ist über den einzelnen Säulen angegeben.

(auf ca. 50% des Kontrollwertes bei 100  $\mu\text{M}$ , 10 d, Abb. 1, Tab. II). Dabei bleiben die Verhältnisse Chlorophyll a/b unverändert (Tab. I). Die Menge der Gesamtcarotinoide nimmt erst nach 10 Tagen leicht ab (100  $\mu\text{M}$ , Abb. 1, Tab. II). Die im Vergleich zur Kontrolle hohen Quotienten Xanthophylle/Carotin (10 d) machen die geringere Hemmung (z. T. Förderung, Tab. I) der Xanthophyllgehalte deutlich.

Die gegenüber den Chlorophyllen schwächere Abnahme der Carotinoidgehalte ist aus den Verhältnissen  $a + b/x + c$  erkennbar (Tab. I). Plastochinon-9<sub>tot</sub> wird nach Herbizidbehandlung insgesamt schwächer als in der Kontrolle akkumuliert, leichte Syntheseförderung bei nur geringer MCPA-Konzentration (1  $\mu\text{M}$ , Abb. 1). Die Gehalte  $\alpha$ -Tocopherol +  $\alpha$ -Toco-

chinon nehmen nach 7 Tagen eher zu, nach 10 Tagen verläuft die Tendenz leicht abnehmend. Die Relationen Chlorophyll a zu den einzelnen Benzochinonen gehen – abhängig von Alter und Herbizidkonzentration – deutlich zurück (Tab. I). Das bedeutet, daß die Benzochinongehalte (bezogen auf Chlorophyll a) in den Herbizid-behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle zunehmen. Ein Maß für diese Zunahme ist der Betrag der prozentualen Veränderung im Vergleich zur Kontrolle. Der Quotient Chlorophyll a/ $\alpha$ -Tocochinon erreicht meist den höchsten Betrag (4 von 5 Werten),  $\alpha$ -Tocochinon wird also relativ zu den anderen Chinonen am schwächsten akkumuliert. Von den 5  $\alpha$ -Tocopherolwerten bilden die jeweils niedrigsten der Chinonwerte,  $\alpha$ -Tocopherol wird relativ am stärksten akkumuliert. Die Plastochinonwerte liegen etwa dazwischen. Nach der relativen Akkumulationsintensität läßt sich also eine Reihe  $\alpha$ -Tocopherol > Plastochinon-9<sub>tot</sub> >  $\alpha$ -Tocochinon ableiten. Eine gesonderte Betrachtung der Werte von oxidiertem und reduziertem Plastochinon (Daten nicht aufgeführt) zeigt außerdem, daß die oxidierte Form bei den 10 Tage alten Pflanzen nach Herbizidzugabe stärker abnimmt als die reduzierte. Die geringere Hemmung der  $\alpha$ -Tocopherolakkumulation im Redoxsystem  $\alpha$ -Tocopherol/ $\alpha$ -Tocochinon wurde schon aus den Relationen Chlorophyll a/Chinone deutlich. Im allgemeinen nehmen also die oxidierten Benzochinongehalte im untersuchten System bei Applikation von MCPA stärker ab als die reduzierten.

In Tab. II ist die Wirkung des Herbizides an absoluten Zahlenwerten verdeutlicht. Aus den Werten der Dunkelkontrollen (4, 7, 10 d) läßt sich eine mit dem Alter der Keimlinge zunehmende Kapazität zur Synthese von Carotinoiden und Prenylchinonen erkennen. Im Licht wird die Akkumulation der Prenyl-lipide nach 7 und 10 Tagen stark erhöht. Diese licht-

Tab. I. Relationen von Pigmenten und Prenylchinonen und Carotinoidgehalte in *Hordeum vulgare* nach Applikation von MCPA (a, Chlorophyll a; b, Chlorophyll b;  $\beta$ -C,  $\beta$ -Carotin; x, Xanthophylle; PQ<sub>tot</sub>, Plastochinon-9+Plastohydrochinon-9; TQ,  $\alpha$ -Tocochinon; T,  $\alpha$ -Tocopherol). Spalte 1, Absolutwerte ( $\mu\text{g}/100$  Sprosse); Spalte 2, Prozentwerte (Kontrolle=100%).

	a/b		$\beta$ -C		x		x/c		a+b/x+c		a/PQ <sub>tot</sub>		a/TQ		a/T	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
7 d Kontrolle	3,7	100	282	100	669	100	2,37	100	6,20	100	22,2	100	534	100	42,0	100
10 $\mu\text{M}$	3,7	100	256	91	614	92	2,38	101	6,04	97	22,8	103	531	99	34,1	81
100 $\mu\text{M}$	3,6	98	250	89	689	106	2,70	114	5,12	83	17,6	79	449	84	30,2	72
10 d Kontrolle	3,5	100	429	100	1081	100	2,52	100	5,23	100	18,1	100	420	100	24,8	100
1 $\mu\text{M}$	3,8	109	410	98	1293	119	3,19	127	4,48	86	15,1	83	589	140	23,9	96
10 $\mu\text{M}$	3,4	96	320	75	1228	114	3,87	154	3,41	65	12,9	71	338	80	16,6	67
100 $\mu\text{M}$	3,4	98	358	83	1029	95	3,48	138	3,08	59	11,3	62	357	85	15,0	60

	a+b	x+c	PQ <sub>tot</sub>	TQ	T
4 d DD	—	39	90	4,4	27
7 d DD	—	168	136	5,4	94
4 d DD+3 d WL (Kontrolle)	5899	951	209	8,7	111
4 d DD+3 d WL (+ 10 $\mu$ M MCPA)	5258	870	181	7,8	121
4 d DD+3 d WL (+100 $\mu$ M MCPA)	4812	939	215	8,4	125
10 d DD	—	457	251	8,6	119
4 d DD+6 d WL (Kontrolle)	7892	1510	339	15	247
4 d DD+6 d WL (+ 1 $\mu$ M MCPA)	7624	1703	398	10	251
4 d DD+6 d WL (+ 10 $\mu$ M MCPA)	5280	1548	317	12	245
4 d DD+6 d WL (+100 $\mu$ M MCPA)	4270	1387	293	9,3	221

Tab. II. Absolute Gehalte an Prenyllipiden ( $\mu$ g/100 Sprosse) im Dunkel, im Licht und nach Applikation von MCPA an belichteten *Hordeum*-Keimlingen. (DD = Dauerdunkel.)

stimulierte Akkumulation der Prenyllipide ist bei MCPA-Applikation in der oben dargelegten Weise verändert (Abb. 1, Tab. I).

Die photosynthetische Aktivität (Hill-Reaktion) der isolierten Chloroplasten zeigt Tab. III. Bei den 7 Tage alten Pflanzen sind die Zahlenwerte nur geringfügig unter Herbizideinfluß verändert. Nach 10 Tagen beobachtet man eine deutliche Erhöhung (+35%) im Vergleich zur Kontrolle auf 10  $\mu$ M MCPA, 100  $\mu$ M MCPA wirkt sich kaum aus.

## Diskussion

Die Gehalte an Prenyllipiden des Photosyntheseapparates in Gerstenkeimlingen werden nach Applikation des Wuchsstoffherbizids MCPA sowohl absolut als auch in ihren Relationen zueinander verändert. Abnehmende Chlorophyllgehalte, zunehmende Verhältnisse Xanthophylle zu Carotine, abnehmende Relationen Chlorophyll zu Carotinoide, abnehmende Verhältnisse Chlorophyll a zu Chinonen, stärkerer Rückgang der Gehalte oxidiert Benzochinone Plastochinon-9 und  $\alpha$ -Tocochinon als der reduzierten  $\alpha$ -Tocopherol und Plastohydrochinon-9 sind sämtlich Kennzeichen, die bei künstlich induzierter Chloroplastendegeneration in Gerste gefunden wurden [7, 8].

Die aus den Quotienten Chlorophyll zu Benzochinonen abgeleitete Reihe unterschiedlicher Akkumula-

tion der einzelnen Chinone im Vergleich zur Kontrolle ( $\alpha$ -Tocopherol > Plastochinon-9<sub>tot</sub> >  $\alpha$ -Tocochinon) läßt vermuten, daß der Stoffwechsel der Prenylchinone infolge Herbizideinflusses in bestimmter Weise umgestellt wird.

Bei Untersuchungen über die Wirkung exogen zugeführter Indol-3-essigsäure (IES) auf den Stoffwechsel der Prenyllipide bei *Raphanus* [9] wurde gefunden, daß IES (0,5 ppm = 2,9  $\mu$ mol/l) die Synthese derjenigen Komponenten besonders fördert, die auch bei der lichtinduzierten Thylakoidsynthese in etiolierten Pflanzen am stärksten akkumuliert werden. Daher errechnet sich aus diesen Daten eine Reihe unterschiedlicher Akkumulationen der Chinone im Vergleich zur Kontrolle von  $\alpha$ -Tocochinon > Plastochinon-9<sub>tot</sub> >  $\alpha$ -Tocopherol unabhängig davon, ob IES bei Aussaat oder am 3. Tage zugegeben wurde (Ernte nach 8 Tagen). Die Chlorophyllsynthese wird bei diesen Experimenten gefördert, ebenso werden die Gehalte der oxidierten Prenylchinone im Vergleich zu den Gehalten der reduzierten gefördert.

Diese Daten der Akkumulation von Prenylchinonen und Chlorophyllen sind den mit MCPA (10, 100  $\mu$ M) erhaltenen Daten gerade entgegengesetzt. MCPA in den angewendeten Konzentrationen fördert offenbar eine Stoffwechselsituation im Chloroplasten, die wie die künstlich induzierte Chloroplastendegeneration [7, 8] eine Art Gegenpol zum ergrünenden Etioplasten bildet. Die Bezeichnung Seneszenz in diesem Zusammenhang ist deshalb wohl berechtigt. Für den Nukleinsäurestoffwechsel und morphologische Veränderungen nach Applikation von Phenoxyherbiziden wurde eine seneszenzfördernde Wirkung ebenfalls angenommen [3].

Die abnehmenden Relationen Chlorophyll a/Chinone (Tab. I) legen eine Reduzierung der Pigmentantenne nahe. Insofern besteht sicherlich eine wichtige Parallele zur Stoffwechselsituation beim Sonnentyp [9] grüner Pflanzen und zur Wirkung der IES [9, 10]. Der leichte Anstieg der a/b-Werte (Tab. I)

Tab. III. Hill-Aktivität ( $\mu$ M O<sub>2</sub>/mg Chlorophyll · h) isolierter Chloroplasten aus *Hordeum*-Keimlingen nach MCPA-Applikation. Alter nach Aussaat. Standardabweichung  $\pm 10\%$ . Mittelwerte aus 3 voneinander unabhängigen Bestimmungen.

	7 Tage		10 Tage	
	1	2	1	2
Kontrolle	36	100	34	100
10 $\mu$ M MCPA	38	106	46	135
100 $\mu$ M MCPA	32	89	32	94

und des Gehaltes an Gesamt-Plastochinon (Abb. 1, Tab. II) auf  $1 \mu\text{M}$  MCPA weisen in dieselbe Richtung. Bei höheren Konzentrationen und in größerem Maße bei 10 Tage alten Pflanzen scheint die Applikation des Herbizids aber verstärkt eine Störung der physiologischen Gesamtsituation herbeizuführen, die durch die oben aufgeführten Kriterien eines Seneszenzzustandes charakterisiert ist.

Mit den Kriterien des Schattenblatttyps [9, 11, 12] sind diese teilweise identisch. Wichtige Unterschiede sind aber die abnehmenden Verhältnisse Chlorophyll a zu Chinonen [7, 8] und die konstant bleibenden [7] oder sogar ansteigenden [8] Chlorophyll a/b-Werte beim Seneszenzzustand.

Die photosynthetische Aktivität (Tab. III) der Gerstekeimlinge ändert sich meist nur geringfügig. Allerdings konnte auch bei der Behandlung isolierter

Chloroplasten mit chlorierten Phenoxyessigsäuren erst bei Konzentrationen von einigen Hundert bis einigen Tausend  $\mu\text{mol/l}$  eine Hemmung der Hill-Reaktion erzielt werden [13]. Das schließt einen Angriff auf die Photosysteme aus, nicht unbedingt aber einen sekundären Einfluß auf die photosynthetische Aktivität. Offenbar war nur unter bestimmten Bedingungen (10 d,  $10 \mu\text{M}$ ) eine deutliche Steigerung zu erzielen. Diese würde allerdings eine weitere Parallele zur physiologischen Situation beim Sonnentyp bedeuten.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für eine Sachbeihilfe. Der Firma BASF AG gebührt Dank für eine Probe von reinem MCPA. Herrn Prof. Lichtenthaler danke ich für anregende Diskussionsgespräche. Frau G. Kuhn trug durch sorgfältige technische Mitarbeit zum Entstehen der Arbeit bei.

- [1] D. H. McRae, R. J. Foster u. J. Bonner, *Plant Physiol.* **28**, 343 (1953).
- [2] J. van Overbeek, *The Physiology and Biochemistry of Herbicides* (L. J. Audus, Ed.), p. 387, Academic Press, New York 1964.
- [3] J. B. Hanson u. F. W. Slife, *Residue Reviews* **25**, 59 (1969).
- [4] R. Ziegler u. K. Egle, *Beitr. Biol. Pflanzen* **41**, 39 (1965).
- [5] A. Hager u. T. Meyer-Bertenrath, *Planta* **69**, 198 (1966).
- [6] H. K. Lichtenthaler, *Planta* **81**, 140 (1968).
- [7] K. H. Grumbach u. H. K. Lichtenthaler, *Z. Naturforsch.* **28 c**, 439 (1973).
- [8] H. P. Pfeiffer, H. K. Kleudgen u. H. K. Lichtenthaler, unveröffentlichte Daten.
- [9] H. K. Lichtenthaler, *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants* (M. Tevini u. H. K. Lichtenthaler, Hrsg.), p. 231, Springer Verlag, Berlin 1977.
- [10] V. Straub u. H. K. Lichtenthaler, *Z. Pflanzenphysiol.* **70**, 34 (1973).
- [11] H. K. Kleudgen, *Z. Naturforsch.* **34 c**, 110 (1979).
- [12] H. K. Kleudgen, *Pestic. Biochem. Physiol.* **9**, 57 (1978).
- [13] D. E. Moreland u. K. L. Hill, *Weeds* **10**, 229 (1962).