

# Die Wirkung von Simazin auf die Bildung der plastidären Prenyllipide in Keimlingen von *Hordeum vulgare* L.

Effect of Simazine on Formation of Chloroplasts Prenyllipids in Seedlings of *Hordeum vulgare* L.

H. K. Kleudgen

Botanisches Institut, Universität Karlsruhe

Z. Naturforsch. **34 c**, 110–113 (1979); eingegangen am 13. November 1978

Herbicide, Simazine, Prenyllipids, Chloroplasts, Regulation

Barley seedlings were grown for 7, 10 or 13 days under continuous white light (Fluora lamps) on a nutrient solution containing simazine (2-chloro-4,6-bis-(ethylamino)-s-triazine, 10, 100  $\mu\text{M}$ ). Accumulation of chlorophylls and in part of carotenoids was increasingly enhanced depending on age and concentrations applied. The ratio chlorophyll a/b decreased on this line in 10 and 13 day old plants, the ratio xanthophylls/ $\beta$ -carotene and the ratio chlorophyll a/prenylquinones (plastoquinone-9<sub>ox.</sub> + red.,  $\alpha$ -tocopherol,  $\alpha$ -tocoquinone) increased. The way how these prenynlipid ratios are changed in 10 and 13 day old plants is characteristic of a shade type adaptation, as it was shown earlier for other herbicides inhibiting photosystem II.

In 7 day old plants the ratio chlorophyll a/prenylquinones decreased. Photosynthetic activity (Hill-reaction) was enhanced in the simazine plants. The ratio chlorophyll a/b was higher, the ratio xanthophylls/ $\beta$ -carotene was lower than in the older seedlings.

Similar changes of prenynlipid ratios like in 7 day seedlings and a higher Hill activity were also found in plants grown under blue light (sun type adaptation) as compared to red light (shade type adaptation). This points to similar metabolic changes in the chloroplasts which could be related to a common site of regulation, perhaps the endogenous cytokinins. The Hill activity, increasing with age in the 10 and 13 day plants, indicates that the mode of action of simazine may be a multiple process resulting to a parallel formation of shade type and sun type characteristics.

## Einleitung

Das Herbizid Simazin (2,4-Bis-(äthylamino)-6-chlor-1,3,5-triazin) wird gemeinhin den Photosyntheseherbiziden zugerechnet. Hemmung der Hill-Reaktion [1, 2] und Fluoreszenzmessungen [3] sprechen für einen Angriff am Photosystem II. Strittig ist bis dahin, ob die Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports als Ursache weiterer Wirkungen der Triazinherbizide und der Photosyntheseherbizide überhaupt anzusehen ist („Starvation“-Hypothese, der Herbizideffekt sollte – beispielsweise durch Glucose-Zusatz – revertierbar sein) oder ob sich bleibende Schäden nach Herbizidapplikation einstellen („Damage“-Hypothese, der Angriffspunkt des Herbizids wäre damit auch außerhalb der Photosysteme zu suchen). Unabhängig davon, ob einer dieser Hypothesen der Vorzug zu geben ist, oder ob beide zutreffen, dürfte für das Verständnis der physiologischen Wirkung der Triazinherbizide die Art der Beeinflussung pflanzlicher Regulationssysteme nicht weniger wichtig sein. Einige

Untersuchungen sprechen für eine Interaktion von Triazinherbiziden mit dem endogenen Cytokinin Spiegel [4, 5]. Dieser andererseits wurde mit der physiologischen Wirkung von Blaulicht [6, 7] bzw. dem Sonnenblatttypus grüner Pflanzen [17] in Zusammenhang gebracht. Im folgenden wird über den Einfluß von Simazin auf die Gehalte an Prenyllipiden der Chloroplasten in Gerste berichtet. Die Ergebnisse sollen mit Daten über die Wirkung von Blaulicht auf die Bildung von Prenyllipiden des Photosyntheseapparates verglichen werden. Die Frage der Charakterisierung von Sonnenblatt- und Schattenblatttyp wird in diesem Zusammenhang diskutiert.

## Material und Methoden

*Hordeum vulgare* L. („Breuns Villa“) wurde bei 22 °C und 80% r. F. in einem Lichtthermostaten (Fluoraleuchten 800  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , Dauerlicht) angezogen. Die Samen keimten zunächst 4 Tage im Dauerdunkel auf Aqua dest. und wurden dann auf 10-prozentige van der Crone-Nährlösung umgesetzt, mit Simazin in Konzentrationen von 10 und 100  $\mu\text{M}$ . Das Herbizid wurde in Methanol vorgelöst. Der

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.

Methanolgehalt der Nährlösung bei Kontrolle und Testansatz betrug 0,5%. Gleichzeitig mit dem Umsetzen auf Nährlösung wurden die Pflanzen belichtet. Die Ernte erfolgte 7, 10 und 13 Tage nach der Aussaat.

Die Prenylipide wurden mit Aceton + Petrolbenzin (Siedepunkt 50–70 °C) homogenisiert und anschließend in Petrolbenzin überführt. Die Chlorophylle wurden spektralphotometrisch aus dem Extrakt [8], die Carotinoide [9] und Benzochinone [10] nach dünnsschichtchromatographischer Trennung bestimmt. Die Standardabweichung der Bestimmungen der Prenylipide beträgt im Mittel  $\pm 8\%$ .

Die Chloroplasten wurden in einem Medium isoliert, das Tris/HCl-Puffer (0,05 M, pH 8), 0,2 M Saccharose, 0,01 M NaCl und 0,005 M  $MgCl_2$  enthielt. Die Hill-Aktivität wurde kolorimetrisch mit Dichlorphenolindophenol (33  $\mu M$ ) bestimmt.

## Ergebnisse

**Chlorophylle und Carotinoide.** Eine 100  $\mu M$  Simazinlösung bewirkt bei 7 Tage alten Pflanzen eine leichte Hemmung, bei 10 Tage alten Pflanzen eine deutliche Förderung der Chlorophyllakkumulation im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 1). Nach 13 Tagen wird schon mit 10  $\mu M$  Simazinlösung eine starke Förderung erzielt. Die Chlorophyll-a/b-Werte zeigen eine in Abhängigkeit von der Konzentration und vom

Alter abnehmende Tendenz (Tab. I). Nach 10 Tagen ist auch die Carotinoidakkumulation bei Simazingabe verstärkt (Abb. 1). Das Verhältnis Xanthophylle zu  $\beta$ -Carotin nimmt bei höherer Simazinkonzentration und abhängig vom Alter der Keimlinge beträchtlich zu. Das Ansteigen des Quotienten geht sowohl auf steigende Xanthophyllgehalte als auch auf abnehmende Carotingehalte zurück (Tab. I).

**Benzochinone.** Plastochinon-9 (gesamt) geht mit zunehmendem Alter der Pflanzen deutlich zurück. Die  $\alpha$ -Tocopherol +  $\alpha$ -Tocochinon-Gehalte liegen durchweg leicht unter dem Kontrollniveau (Abb. 1). Die Relationen Chlorophyll zu den einzelnen Benzochinonen können Aufschlüsse liefern über Veränderungen des Photosyntheseapparates bei Herbizidapplikation. Tab. I zeigt deutlich, daß nach 7 Tagen diese Werte allgemein unter dem Kontrollniveau liegen, nach 10 und 13 Tagen darüber. Bezogen auf Chlorophyll a werden diese Chinone also bei jüngeren Pflanzen (7 Tage) stärker akkumuliert als in der Kontrolle, bei den älteren Pflanzen (10, 13 d) ist die Chinonakkumulation im Vergleich zur Kontrolle gehemmt.

Aus den auf Simazin angezogenen Pflanzen wurden Chloroplasten isoliert und deren photosynthetische Aktivität (Hill-Aktivität) bestimmt. Tab. II zeigt, daß die Hill-Aktivität bei Simazinapplikation generell ansteigt. Dieser Effekt nimmt mit dem Alter der Keimlinge zu, er ist bei 10  $\mu M$  Simazin am stärksten ausgeprägt.

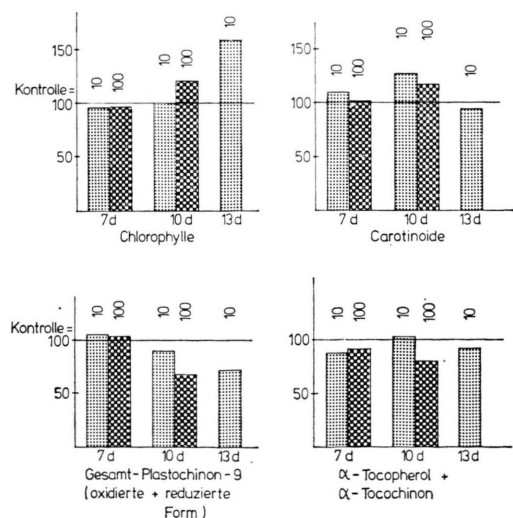


Abb. 1. Die Wirkung von Simazin auf die Akkumulation an Pigmenten und Prenylchinonen in *Hordeum*-Keimlingen unter Dauerlicht. Kontrolle=100%. Die jeweilige Herbizidkonzentration ( $\mu M$ ) ist über den Säulen angegeben.

## Diskussion

Nach den hier aufgeführten Daten lassen sich Veränderungen in der Zusammensetzung des Photosyntheseapparates nach Applikation von Simazin durch Veränderung der Relationen verschiedener Prenylipide charakterisieren. Dabei muß zwischen verschiedenen Entwicklungsstadien der Keimlinge unterschieden werden. 10 und 13 Tage alte Simazinpflanzen weisen mit Alter und Konzentration abnehmende Verhältnisse Chlorophyll a/b, zunehmende Quotienten Xanthophylle zu  $\beta$ -Carotin und zunehmende Quotienten Chlorophyll a zu einzelnen Benzochinonen (Plastochinon-9 tot.,  $\alpha$ -Tocochinon,  $\alpha$ -Tocopherol) auf. Bei Behandlung mit dem Harnstoffherbizid Methabenzthiazuron wurden ganz gleichartige Veränderungen gefunden. Diese lassen sich aufgrund der Analogie zu Schattenblättern als die Induktion eines Schattenblatttypus durch das Herbizid verstehen [11].

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

	a/b		$\beta$ -C		x		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
7 d Kontrolle	3,71	100	282	100	669	100	2,37	100	22,2	100	534	100	41,9	100
10 $\mu\text{M}$	3,42	92	284	100	756	113	2,66	112	19,5	88	440	82	45,4	108
100 $\mu\text{M}$	3,26	89	257	91	706	106	2,75	116	20,0	90	415	78	43,1	103
10 d Kontrolle	3,48	100	429	100	1081	100	2,52	100	18,1	100	420	100	24,8	100
10 $\mu\text{M}$	2,72	78	397	93	1523	141	3,84	152	18,9	104	518	123	22,5	91
100 $\mu\text{M}$	2,57	74	347	81	1436	133	4,13	164	30,1	166	718	171	34,5	139
13 d Kontrolle	3,62	100	514	100	805	100	1,64	100	8,4	100	215	100	9,4	100
10 $\mu\text{M}$	2,39	66	276	54	969	120	3,51	214	16,6	198	300	140	14,5	154

Diese Interpretation wird auch durch andere physiologische Kriterien gestützt [12], wenn auch die Frage des primären Wirkungsmechanismus unklar bleibt [13]. Dikotyle Pflanzen (*Raphanus*) scheinen nach Applikation der Photosyntheseherbizide Bentazon und DCMU ebenfalls zur Ausbildung eines Schattentyps veranlaßt zu werden [14].

Die Veränderung der Benzochinongehalte unter Simazineinfluß ist unterschiedlich innerhalb dieser Gruppe. Bei 10-Tage-Pflanzen ist der Quotient a/T (Tab. I) am niedrigsten: auf Chlorophyllbasis wird  $\alpha$ -Tocopherol von den Benzochinonen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollwerten am stärksten akkumuliert (oder am schwächsten gehemmt bei Berücksichtigung der absoluten Änderungen). Man erhält für die 10-Tage-Pflanzen auf diese Weise ein „Akkumulationsmuster“  $\alpha$ -Tocopherol > Plastochinon-9 >  $\alpha$ -Tocochinon. Aus den Daten über Methabenzthiazuron [11] läßt sich für 9 und 13 Tage alte *Hordeum*-Keimlinge genau das gleiche Muster ableiten. Es erscheint also möglich, daß dieses den Stoffwechseltypus „Schattenblatt“ näher kennzeichnet.

Tab. II. Hill-Reaktion ( $\mu\text{M O}_2/\text{mg Chlorophyll} \cdot \text{h}$ ) isolierter Chloroplasten aus *Hordeum*-Keimlingen nach Applikation von Simazin. Alter nach Aussaat. Standardabweichung  $\pm 10\%$ . Mittelwerte aus 3 voneinander unabhängigen Bestimmungen. Spalte 1 Absolutwerte; Spalte 2 Relativwerte (Kontrolle=100%).

	7 Tage		10 Tage		13 Tage	
	1	2	1	2	1	2
Kontrolle	36,3	100	34,3	100	29,2	100
10 $\mu\text{M}$ Simazin	42,5	118	44,2	129	39,7	136
100 $\mu\text{M}$ Simazin	37,5	103	39,0	114	41,4	142

Bei den 7 Tage alten Pflanzen sind die Verhältnisse Chlorophyll a/Benzochinone fast durchweg niedriger als in der Kontrolle (Tab. I). Die Akkumulation der Benzochinone auf Chlorophyllbasis erfolgt jetzt nach  $\alpha$ -Tocochinon > Plastochinon-9 >  $\alpha$ -Tocopherol. Die a/b-Werte liegen höher als nach 10 und 13 Tagen, die x/c Verhältnisse sind niedriger. Die Relationen der Prenyllipide ändern sich nach 7 Tagen also in einer im Vergleich zu 10 und zum Teil 13 Tagen gegensätzlichen Weise. Das Akkumulationsmuster der Benzochinone ist direkt umgedreht.

Die gleichen Charakteristika wie bei den 7-Tage-Pflanzen findet man bei Gerstenkeimlingen, die im Blaulicht [15] angezogen wurden, wenn man sie mit den entsprechenden Rotlichtpflanzen [16] vergleicht. Aus diesen Daten errechnet sich für das Verhältnis der Akkumulationsraten im Blaulicht verglichen mit Rotlicht für  $\alpha$ -Tocochinon ein Faktor x 2,7, für Plastochinon-9 x 1,3, für  $\alpha$ -Tocopherol x 1,0. Diese Raten ergeben sich aus den Gehalten nach 24-stündiger Bestrahlung bezogen auf die Ausgangswerte vor Beginn der Bestrahlung. Blaulicht aber entspricht in seiner Wirkung auf den Stoffwechsel der Prenyllipide weitgehend dem Sonnentyp, Rotlicht dem Schattentyp [17]. Es sieht also so aus, als würde das Herbizid Simazin eine Art Switch-Mechanismus induzieren, der bei jüngeren Pflanzen (7 Tage) im Prenyllipid-Stoffwechsel Sonnentyp induziert, bei älteren (10, 13 Tage) Schattentyp.

Die höhere Hill-Aktivität nach Simazin-Applikation (Tab. II) paßt bei den 7-Tage-Pflanzen in das Konzept der Sonnentyp-Induktion. Auch beim Sonnentyp zeigen die Chloroplasten erhöhte photosynthetische Aktivität [17, 18].

Bei Schattenpflanzen ist die Hill-Aktivität jedoch niedriger als bei vergleichbaren Sonnenpflanzen. Die höheren Quotienten  $a/Benzochinone$  drücken ja auch eine Abnahme der Gehalte an Carriermolekülen des Elektronentransportsystems im Verhältnis zur Antenne aus. Die Hill-Aktivität 10 und 13 Tage alter Keimlinge ist aber noch stärker erhöht als die der 7 Tage alten. Man muß deshalb wohl annehmen, daß das Herbizid noch weitere Wirkungen in der Pflanze hervorbringt, die für das Zustandekommen der photosynthetischen Aktivität maßgebend sind. Von manchen Autoren wurde ein direkter Einfluß der Triazinherbizide auf Nucleinsäure- und Proteinsynthese postuliert [19, 20]. Andererseits werden Sonnentyp- bzw. Blaulichtpflanzen in dem geschilderten Sinne und höhere Hill-Aktivität in *Raphanus* auch durch Applikation exogenen Cytokinins induziert [17, 18, 21]. Auch für verschiedene andere physio-

logische Parameter werden analoge Parallelen berichtet [6]. Synergistische Effekte von Atrazin und Kinetin auf Chlorophyllakkumulation [5] und Kaluswachstum [4] und weitere Wachstumsreaktionen von s-Triazinen [22, 23] sprechen für eine cytokinin-ähnliche Wirkung von Triazinherbiziden. Vielleicht läuft sowohl die Wirkung von Blaulicht als auch die der Triazinherbizide in allen hier untersuchten Stadien der Keimlingsentwicklung über eine Veränderung des endogenen Cytokininspiegels als dem Vermittler dieser exogenen Faktoren ab.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für eine Sachbeihilfe. Die Firma CIBA-Geigy AG stellte freundlicherweise eine Probe reinen Simazins zur Verfügung. Herrn Prof. Lichtenthaler danke ich für wertvolle Diskussionen, Frau G. Kuhn für gewissenhafte technische Mitarbeit.

- [1] B. Exer, *Weed Res.* **1**, 233 (1961).
- [2] D. E. Moreland u. K. L. Hill, *Weeds* **10**, 229 (1962).
- [3] G. Zweig, I. Tamas u. E. Greenberg, *Biochim. Biophys. Acta* **66**, 196 (1963).
- [4] E. Ebert u. Ch. J. van Assche, *Experientia* **25**, 758 (1969).
- [5] L. Iliev u. G. Vassilev, *C. R. Acad. Agric. G. Dimitrov* **8**, 5 (1975).
- [6] H. Göring u. A. A. Mardanov, *Biol. Rundschau*, **14**, 177 (1976).
- [7] S. S. Zeinalova, *Fiziologija rastenij* **16**, 196 (1969).
- [8] R. Ziegler u. K. Egle, *Beitr. Biol. Pflanzen* **41**, 39 (1965).
- [9] A. Hager u. T. Meyer-Bertenrath, *Planta* **69**, 198 (1966).
- [10] H. K. Lichtenthaler, *Planta* **81**, 140 (1968).
- [11] H. K. Kleudgen, *Pestic. Biochem. Physiol.* **9**, 57 (1978).
- [12] C. Fedtke, *Pestic. Biochem. Physiol.* **4**, 386 (1974).
- [13] C. Fedtke, *Weed Sci.* (1978), im Druck.
- [14] C. Buschmann, G. Burkhard u. H. K. Lichtenthaler, *Arbeitstagung Pflanzliche Lipide*, Mainz, 6.—8.10. 1977, Abstractband.
- [15] H. K. Kleudgen u. H. K. Lichtenthaler, *Z. Naturforsch.* **29 c**, 142 (1974).
- [16] K. H. Grumbach u. H. K. Lichtenthaler, *Z. Naturforsch.* **30 c**, 337 (1975).
- [17] H. K. Lichtenthaler, *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants* (M. Tevini u. H. K. Lichtenthaler, Hrsg.), p. 231, Springer Verlag, Heidelberg.
- [18] C. Buschmann, D. Meier, H. Kleudgen u. H. K. Lichtenthaler, *Photochem. Photobiol.* **27**, 195 (1978).
- [19] F. M. Ashton u. A. S. Crafts, *Mode of Action of Herbicides*, p. 310 ff., John Wiley & Sons Publ., New York 1973.
- [20] E. L. Pulver u. S. K. Ries, *Weed Sci.* **21**, 233 (1973).
- [21] C. Buschmann u. H. K. Lichtenthaler, *Z. Naturforsch.* **32 c**, 789 (1977).
- [22] H. M. Nadar, M. D. Clegg u. J. W. Maranville, *Plant Physiol.* **56**, 747 (1975).
- [23] C. G. P. Pillai u. D. E. Davis, *Weed Sci.* **21**, 461 (1973).