

Phyton (Austria)	Vol. 15	Fasc. 1-2	87-101	30. 8. 1973
------------------	---------	-----------	--------	-------------

Quantitative Bestimmung wasserlöslicher Sulphydrylverbindungen in gesunden und SO₂-geschädigten Nadeln von *Picea abies*

Von

Dieter GRILL *) und Hermann ESTERBAUER **)

Aus den Instituten für Anatomie und Physiologie der Pflanzen und für Biochemie der Universität Graz

Mit 4 Abbildungen

1. Einleitung

Zahlreiche ältere und neuere Untersuchungen ergaben, daß Pflanzen befähigt sind, aus schwefelhaltigen Immissionen dieses Element einzubauen (WIELER 1905, STOKLASA 1923, THOMAS et al. 1943, THOMAS, HENDRICKS & HILL 1944, KATZ & McCALLUM 1952, WEIGL & ZIEGLER 1962, FALLER & HÖFNER 1968 u. a.). Dabei zeigte sich, daß der aufgenommene und eingebaute Schwefel sowohl in anorganischer als auch in organischer Form vorliegen kann. Unter den organischen S-Verbindungen zählen solche mit SH-Gruppen zu den interessantesten, da sie bei zahlreichen physiologischen Vorgängen eine wesentliche Rolle spielen (MAPSON 1959).

In dieser Arbeit berichten wir über Methoden und Untersuchungen, die zum Ziel hatten, den Gesamtsulphydrylgehalt und den Anteil an Glutathion bzw. Cystein in wässrigen Extrakten von Fichtennadeln festzustellen. Außerdem soll ermittelt werden, wie weit sich der SH-Gehalt wasserlöslicher Verbindungen SO₂-beeinflusster Fichten von dem \pm unbeeinflusster unterscheidet.

2. Material und Methodik

Für die Untersuchungen wurden Nadeln des letzten Jahrganges in der Zeit von Oktober 1971 bis Jänner 1972 gesammelt. Dabei wurde keine

*) Dr. Dieter GRILL, Institut für Anatomie und Physiologie der Pflanzen, Schubertstraße 51, A-8010 Graz.

***) Dr. Hermann ESTERBAUER, Institut für Biochemie, Halbärthgasse 5, A-8010 Graz.

Rücksicht auf Alter und Standort der Bäume genommen, dagegen Luftverunreinigungen in Form von SO_2 große Beachtung geschenkt. Rauchgeschädigtes Material stammte aus einem Industriegebiet in der Obersteiermark, die Kontrollen aus dem \pm abgasfreien Gebiet von Maria Trost bei Graz. Der Grad der Schädigung der Bäume wurde nach äußerlich sichtbaren Symptomen bzw. anderen Schadensbestimmungen, wie Trübungstest (HÄRTEL 1960) und UV-Untersuchungen (GRILL 1972) festgestellt. Die Nadeln wurden möglichst schnell nach dem Sammeln untersucht.

2.1. Verwendete Abkürzungen

I:	Nadeln aus dem Immissionsgebiet
K:	Kontrollnadeln aus abgasfreien Gebieten
CySH:	Cystein
GSH:	Glutathion
CySSCy:	Cystin
GSSG:	oxydiertes Glutathion
DTNB:	5,5'-Dithiobis-nitrobenzoesäure
EDTA:	Äthylendiaminotetraessigsäure
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

2.2. Herstellung des Extraktes und Trockengewicht der Nadeln

Für die Untersuchung wird jeweils die eine Längshälfte der Triebe für die Herstellung des Extraktes, die andere für die Trockengewichtsbestimmung verwendet.

2 g frische Nadeln werden mit ca. 10 ml 1.10^{-4} M EDTA-Lösung im Ultraturrax 1 min lang homogenisiert. Das Homogenat wird auf 20 ml aufgefüllt und dann durch eine kleine Nutsche (Filter S&S 602 eh) gesaugt. Das Filtrat ist vollkommen klar und schwach grün-gelb gefärbt. Der auf diese Weise hergestellte Extrakt wird für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Trockenrückstand des Extraktes: 2 ml Extrakt werden bei 120° eingedampft und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Trockengewicht der Nadeln: 2 g frische Nadeln werden bei 120° gewichtskonstant getrocknet.

2.3. Bestimmung der SH-Konzentration des Extraktes mit DTNB

(Modifiziertes Verfahren nach ELLMANN 1959)

DTNB-Reagens: 3,96 mg DTNB in 10 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 7. — 1. Messung: 2 ml Extrakt werden mit 2 ml DTNB gemischt und sofort in 1-cm- bzw. 2-cm-Küvetten bei 412 nm gegenüber einem Vergleich

aus 2 ml Extrakt und 2 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,0 gemessen: E_I . — 2. Messung: 2 ml H_2O + 2 ml DTNB werden gegen 2 ml H_2O + 2 ml Phosphatpuffer gemessen: E_{II} . — Aus den beiden Messungen errechnet sich die SH-Konzentration des Extraktes nach $SH = \Delta E \cdot 2 / \epsilon \cdot d$ (Mole/l) ($\Delta E = E_I - E_{II}$, d = Schichtdicke, $\epsilon = 13.600$). — Die SH-Konzentration wird schließlich auf 1 g Trockengewicht der Nadeln bezogen: Mikro-Mole SH/g Trockengewicht.

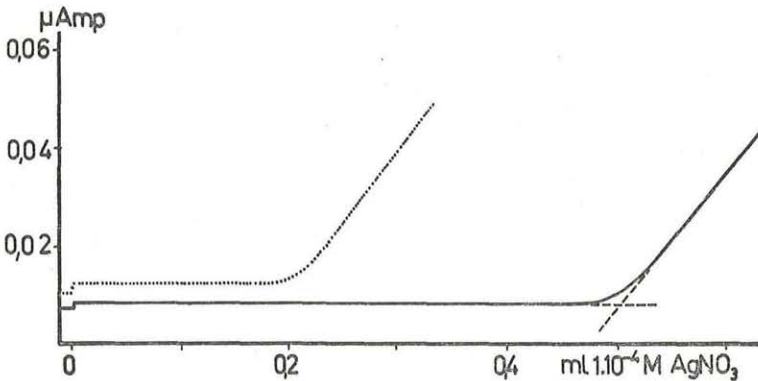


Abb. 1. Bestimmung der SH-Konzentration durch amperometrische Titration mit $AgNO_3$. — 5 ml Extrakt I vom 8. 2. 1972; 5 ml Extrakt K vom 20. 12. 1971.

2.4. Bestimmung der SH-Konzentration des Extraktes durch amperometrische Titration mit $AgNO_3$ (nach COLE, STEIN, MOORE 1958)

Zu 5 ml Extrakt werden 10 ml 0,02 M KCl-Lösung und 5 ml 0,4 M Trispuffer pH 7,0 gegen und sofort mit $1 \cdot 10^{-3}$ M $AgNO_3$ -Lösung titriert; als Indikatorelektrode dient eine rotierende Platinelektrode (Fa. Radiometer, Kopenhagen), als Vergleichselektrode dient eine gesättigte Kalomелеlektrode; die Strombrücke wurde aus gesättigter KCl-Lösung und Agar-Agar hergestellt. Als Anzeigegerät und Schreiber wird ein Polarograph (Polariter PO 4, Radiometer, Kopenhagen) verwendet. Mit dem Polarographen wird an die Pt-Elektrode ein Potential von ca. $-0,05$ Volt angelegt. Die $AgNO_3$ -Lösung wird mit einer 2,5 ml-Motorbürette (ABU 12, Radiometer) kontinuierlich zugegeben. Der Titrationsendpunkt wird in bekannter Weise graphisch bestimmt (vgl. Abb. 1).

2.5. Bestimmung von CySH und GSH

CySH und GSH werden säulenchromatographisch voneinander getrennt und im Eluat mit DTNB quantitativ bestimmt. Der für die Trennung verwendete Acetatpuffer ist 0,02 molar, hat ein pH von 4,0 und enthält $1 \cdot 10^{-4}$ M EDTA. Der Puffer wird durch ständiges Durchperlen von Reinststickstoff sauerstofffrei gehalten.

Eine kleine Säule ($1,5 \times 30$ cm) wird 27 cm hoch mit DEAE-Sephadex A 25 (Pharmacia, Uppsala) gefüllt und mit Acetatpuffer äquilibriert. Aufgetragen werden ca. 10 ml Probelösung (unveränderter Extrakt oder 20–40 ml Extrakt, der durch Gefriertrocknung auf etwa 10 ml eingengt wurde), die durch 10 min langes Durchperlen von N_2 sauerstofffrei gemacht wurde. Eluiert wird mit 120 ml Acetatpuffer steigender Natriumchloridkonzentration. Der NaCl-Gradient wird linear von 0,0 auf 0,6 M erhöht. Zum Schluß wird noch mit 50 ml Acetatpuffer—2 M NaCl eluiert. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt 1 ml/min, es werden 3 ml-Fractionen gesammelt. Um CySH und GSH im Eluat nachzuweisen, wird zu jeder Fraktion 1 ml DTNB-Reagens (100 mg DTNB in 100 ml 1 M Kaliumphosphatlösung pH 7,0) gegeben und sofort E_{412}^{2cm} gegen einen Blindwert aus 3 ml Acetatpuffer + 1 ml DTNB-Reagens gemessen. Auftragen der Extinktionen gegen die Fraktionsnummern ergibt das Säulenchromatogramm der SH-Verbindungen des Extraktes (vgl. Abb. 2a). Der erste peak ist CySH (Fr. 10–16), der zweite peak ist GSH (Fr. 28–36). Sulfit wird erst mit 2 molarem NaCl nach GSH eluiert. Die GSH-Konzentration des aufgetrennten Extraktes wird nach den folgenden Formeln berechnet:

$$\text{GSH (Mole/l)} = \Sigma E \times 4 \times 10^{-5} / 1,36 \times 2 \times v \quad (\Sigma E = \text{Summe der Werte von } E_{412}^{2cm} \text{ der Fraktionen } 28-36;$$

$$v = \text{Volumen des aufgetrennten Extraktes in ml}).$$

In gleicher Weise berechnet man die CySH-Konzentration aus den Extinktionen der Fraktionen 10–16.

2.6. Bestimmung von CySSCy und GSSG

Das im Extrakt vorhandene Cystin bzw. GSSG wird nach der allgemeinen Gleichung $RSSR + H_2SO_3 \rightarrow RSH + RSSO_3H$ gespalten und das gebildete CySH bzw. GSH nach säulenchromatographischer Trennung bestimmt. Zu 10 ml Extrakt gibt man 0,5 ml $5 \cdot 10^{-1}$ M Na_2SO_3 -Lösung und stellt mit Essigsäure ein pH von 4,0 ein. Nach einstündigem Stehen wird der Ansatz wie vorher beschrieben säulenchromatographisch über DEAE-Sephadex A 25 getrennt und im Eluat CySH bzw. GSH mit DTNB bestimmt. Aus den nach Spaltung mit Na_2SO_3 erhaltenen CySH bzw. GSH-Konzentrationen ($CySH_{SO_3}$ bzw. GSH_{SO_3}) und den ursprünglich vor-

handenen Konzentrationen von CySH bzw. GSH werden die CySSCy bzw. GSSG-Konzentrationen berechnet. $CySSCy = CySH_{SO_3} - CySH$ (Mole/l), $GSSG = GSH_{SO_3} - GSH$ (Mole/l). Da es sich bei dieser Bestimmung um eine Differenzmethode handelt, können nur solche Messungen ausgewertet werden, bei denen die Werte für $CySH_{SO_3}$ bzw. GSH_{SO_3} mindestens 20% bzw. 5% größer sind als die CySH- bzw. GSH-Werte und damit erheblich über der Standardabweichung der säulenchromatographischen CySH- bzw. GSH-Bestimmungsmethoden liegen.

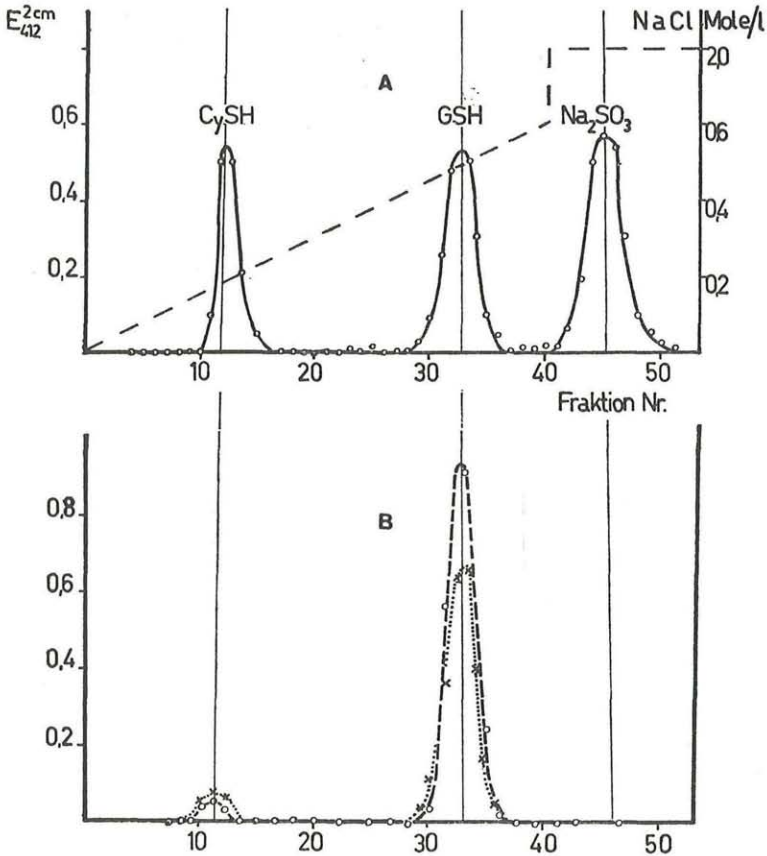


Abb. 2. A: Elutionskurve eines künstlichen Gemisches aus CySH, GSH und Na_2SO_3 : — — — — Konzentration des NaCl im Elutionsmittel. — B: Elutionskurve von Fichtennadelextrakten. Der NaCl-Gradient wurde wie bei 2A geändert: . . . x . . . 20 ml Extrakt K vom 6. 12. 1971, — — — o — — — 10 ml Extrakt I vom 12. 11. 1971.

3. Ergebnisse

3.1. SH-Konzentration der Extrakte

Messung der SH-Konzentration mit DTNB: Der Fichtennadelextrakt hat einen pH von ca 4,0 und ist schwach grüngelb gefärbt. Erhöht man durch Zusatz von Phosphatpuffer den pH von 4,0 auf 7,0, so wird die Gelbfärbung des Extraktes stärker. Wie Abb. 3 zeigt, nimmt $E_{412 \text{ nm}}$ zunächst sehr schnell und dann langsam zu. Die durch pH-Erhöhung bewirkte Gelbfärbung und die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme war bei den einzelnen Extrakten verschieden. Gibt man zu dem gelb gefärbten, auf pH 7,0 eingestellten Extrakt noch DTNB-Reagens, so steigt durch den SH-Gehalt des Filtrates E_{412} wieder sprunghaft an, bei längerem Stehen nimmt E_{412} meist ganz langsam zu. Bei manchen Extrakten blieb die Extinktion aber auch konstant oder nahm sogar ab. Aus der nach DTNB-Zusatz bewirkten Extinktionsänderung kann der SH-Gehalt des Extraktes nur ungenau berechnet werden. Bereits zu Beginn unserer

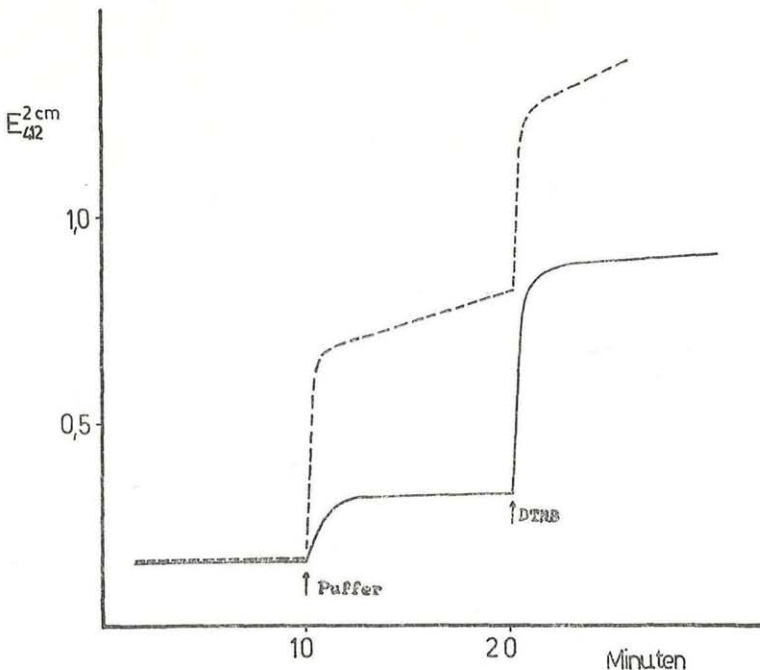


Abb. 3. Zunahme der Gelbfärbung (E_{412}) eines Extraktes I nach Zusatz von Puffer und DTNB. Probeküvette: 4 ml Extrakt + 1 ml Puffer + 0,25 ml DTNB; Vergleichsküvette: 4 ml H_2O + 1 ml Puffer + 0,25 ml DTNB.

----- pH 8,0 ————— pH 7,0.

Untersuchungen stellten wir nämlich fest, daß bei manchen Extrakten der SH-Gehalt umso kleiner gefunden wird, je länger die Probe vor der DTNB-Zugabe bei pH 7,0 steht. Bei pH 8,0 nimmt die SH-Konzentration der Extrakte allgemein schon innerhalb von Minuten ab. Diese Schwierigkeiten sind zu umgehen, wenn man die SH-Konzentration nach der im Kapitel Methoden beschriebenen Weise mißt, d. h. Puffer und DTNB gleichzeitig dem Extrakt zusetzt. Die Reproduzierbarkeit dieser Messungen ist gut; bei fünf Bestimmungen an einem Extrakt betrug der mittlere Fehler des Mittelwertes $\pm 1\%$ (Tab. 1). Setzt man einem Extrakt, dessen SH-Konzentration bekannt ist, Cystein oder GSH zu, so findet man für die neue SH-Konzentration die berechneten Werte (Tab. 2). Es kann daher mit größter Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß die mit der beschriebenen DTNB-Methode bestimmten Werte nicht nur gut reproduzierbar, sondern auch richtig sind. Dafür spricht auch, daß die Werte gut mit den Werten der Silbernitrat-Titration übereinstimmen.

Messung der SH-Konzentration durch Titration mit AgNO_3 : Die amperometrische Titration von SH-Gruppen mit AgNO_3 wird gewöhnlich in ammoniakalischer Lösung durchgeführt. Titriert man aber Fichtennadelextrakt in ammoniakalischer Lösung, so ist kein Verbrauch an AgNO_3 festzustellen. Auch CySH bzw. GSH, das dem Extrakt in Mengen von ca. $1 \cdot 10^{-4}$ Mole/l Extrakt zugesetzt wird, läßt sich in NH_3 -Lösung nicht bestimmen. Wir vermuten, daß der Extrakt bestimmte Substanzen, z. B. Maltol (HEGNAUER 1962), enthält, die besonders in alkalischer Lösung schnell mit SH-Verbindungen reagieren und damit diese dem Nachweis entziehen.

Titriert man dagegen in Trispuffer bei pH 7,0, so läßt sich der SH-Gehalt des Extraktes exakt bestimmen. In Vorversuchen wurde sichergestellt, daß CySH und GSH den berechneten Verbrauch von 1 Mol AgNO_3 /1 Mol SH ergeben.

Aus der Tabelle geht hervor, daß diese Methode gut reproduzierbare Werte ergibt, die innerhalb der Fehlergrenze mit den Werten der DTNB-Bestimmung übereinstimmen. Wird zu einem Extrakt, dessen SH-Konzentration bekannt ist, CySH oder GSH zugegeben, so findet man für die neue SH-Konzentration bei der AgNO_3 -Titration praktisch genau den berechneten Wert (Tab. 1, 2).

Stabilität der Fichtennadelextrakte: Wird ein Extrakt nach der Herstellung längere Zeit gelagert, so nimmt allgemein die SH-Konzentration ab. Die Geschwindigkeit der Abnahme der SH-Konzentration ist — unter sonst gleichen Bedingungen — bei den einzelnen Extrakten verschieden. Im allgemeinen fanden wir aber das in Abb. 4 wiedergegebene Verhalten. Der SH-Gehalt nimmt danach bei längerem Stehen bei 20° langsam ab (Kurve 1); bei 4°C bleibt der SH-Gehalt mehrere Tage unverändert (Kurve 2). Einige Extrakte aus I und K fielen allerdings dadurch auf,

daß auch bei 4° die SH-Konzentration innerhalb von 24 h um etwa die Hälfte abnahm. Dieses unterschiedliche Verhalten dürfte mit unterschiedlichem Gehalt an Substanzen (z. B. Maltol) zusammenhängen, die mit SH-Gruppen reagieren.

Wird der pH-Wert der Extrakte (pH 4,0) erhöht, so nimmt mit steigendem pH die Stabilität der SH-Konzentration ab (Kurve 3). Wie Kurve 4 zeigt, kann dem Extrakt zugesetztes CySH nur in den ersten Stunden quantitativ nachgewiesen werden (vgl. auch Tab. 2), bei längerem Stehen bei 20° nimmt der CySH-Gehalt zunächst langsam und schließlich sprunghaft ab. Glutathion ist wesentlich stabiler (Kurve 5). Wird der Extrakt bei 4° C gelagert, so kann zugegebenes CySH bzw. GSH nach 24 h quantitativ nachgewiesen werden. Da die Fichtennadlextrakte ein pH von ca 4,0 hatten, bei 4° C gelagert und immer kurz (2–10 h) nach der Herstellung untersucht wurden, kann sicher angenommen werden, daß die bestimmten SH-Konzentrationen bzw. CySH und GSH-Werte den Werten in den Fichtennadeln entsprechen.

3.2. Quantitativer Nachweis von Cystein und Glutathion

Mit der DTNB-Reaktion bzw. der Silbernitrat titration wird nur der Gesamt-SH-Gehalt erfaßt. Es war nun von Interesse, festzustellen, welche SH-Verbindungen in den Extrakten vorliegen. Trennungen auf Sephadex G 25 zeigten, daß keine SH-Proteine, sondern nur niedermolekulare SH-Verbindungen im Filtrat sind, wobei angenommen werden darf, daß es sich wahrscheinlich um CySH und GSH handelt. In rauchgeschädigten Nadeln könnten auch noch kleinere Mengen an Sulfit, das ebenfalls eine positive DTNB-Reaktion gibt, vorhanden sein. Eine enzymatische Bestimmung von GSH (RACKER 1951, WILLAND, DOSE & PFLEIDERER 1955) ist wegen der niedrigen Konzentrationen und der Anwesenheit zahlreicher UV-absorbierender Substanzen im Extrakt nicht möglich.

Eine gute Trennung von CySH, GSH und Sulfit kann mit dem Anionen-Austauscher DEAE-Sephadex A 25 erreicht werden. Im Eluat lassen sich die Verbindungen mit DTNB quantitativ bestimmen. Abb. 2a zeigt die Auftrennung eines Modellgemisches von CySH, GSH und Na_2SO_3 . Die Zuordnung der einzelnen peaks wurde auf Grund von Trennungen der Einzelsubstanzen durchgeführt. Die Trennung eines Filtrates aus rauchgeschädigten Nadeln und eines aus ungeschädigten Nadeln zeigt Abb. 2b. Die Elutionskurven zeigen, daß der SH-Gehalt von Fichtennadeln unabhängig von Umwelteinflüssen hauptsächlich auf den GSH-Gehalt und nur zu einem sehr geringen Teil auf den CySH-Gehalt zurückzuführen ist. Der CySH-Gehalt war in den meisten Filtraten so klein (vgl. Tab. 3), daß erst bei Auftrennung von ankonzentrierten Extrakten ein deutlicher Cystein-peak erscheint. Die Elutionsvolumina der peaks entsprechen genau den Elutionsvolumina des CySH und GSH in Abb. 2a, so daß es sich im Filtrat

zweifellos um diese beiden SH-Verbindungen handelt. Sulfid konnte in den geschädigten Nadeln nicht nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung der Standardabweichungen und der Wiederauffindungsraten wurden an einem Extrakt fünf Bestimmungen des CySH- und GSH-Gehaltes durchgeführt. Dabei ergaben sich folgende Werte:

SH-Gehalt des gesamten Extraktes:	60 μ Mole/l	
GSHgefunden:	52,3 \pm 3,6	μ Mole/l
CySHgefunden:	0,64 \pm 0,23	μ Mole/l
Wiederauffindungsrate ((CySH+GSH) \times 100%/Gesamt-SH):	80—94%	

Der größere Fehler bei der CySH-Bestimmung ist verständlich, weil die CySH-Konzentration in den Extrakten um ca. 0—2 μ Mole/l (im untersuchten Fall 0,64 μ Mole/l) beträgt und damit an der unteren Grenze der Bestimmbarkeit durch absorptions-spektroskopische Methoden (DTNB-Bestimmung) liegt. Die Wiederauffindungsrate war in keinem Fall 100% der eingesetzten SH-Menge. Auch bei der Trennung von Modellgemischen findet man nur 80,5% \pm 14% des CySH bzw. 88,6% \pm 13% des GSH im Eluat wieder.

Die Ergebnisse der quantitativen CySH-, GSH- bzw. CyssCy- und GSSG-Bestimmung in einigen Extrakten I und K enthält Tab. 3. Eine Anzahl weiterer Bestimmungen, die in der Tabelle nicht angeführt sind, ergaben durchaus vergleichbare Werte. Die Tabelle zeigt, daß GSH in allen Extrakten eindeutig nachgewiesen werden kann, es stellt mit 98,5% bzw. 97,7% sowohl in rauchgeschädigten Nadeln als auch in ungeschädigten Nadeln den Hauptanteil der wasserlöslichen SH-Verbindungen dar. Demgegenüber sind nur 1,5% (K) bzw. 2,3% (I) des Gesamt-SH-Gehaltes auf CySH zurückzuführen. In einigen Fällen ließ sich CySH nicht nachweisen.

Oxydiertes CySH und GSH kommt in den Nadeln ebenfalls nur in kleinen Mengen vor.

3.3. SH-Gehalt in Extrakten gesunder und rauchgeschädigter Nadeln

Der SH-Gehalt von Fichtennadeln wird von den Umweltbedingungen stark beeinflusst. Erwartungsgemäß hat der jahreszeitliche Rhythmus auf die Sulfhydrylkonzentration einen Einfluß. Die bisherigen Messungen zeigen an, daß der SH-Gehalt beim Übergang von der Herbst- in die Winterperiode bis zu 300% zunimmt, und zwar unabhängig vom Standort der Bäume. Diese Zunahme der SH-Konzentration ist, wegen des geringen Gehalts der Nadeln an CySH, ausschließlich auf die Zunahme des Glutathion zurückzuführen. Genaue Untersuchungen über den Jahresgang des SH-Gehalts werden zur Zeit durchgeführt.

Am bemerkenswertesten scheint aber der Einfluß von Rauchschäden auf die SH-Konzentration der Fichtennadeln. Schon aus Tab. 3 geht deut-

lich hervor, daß der SH-Gehalt in Nadeln rauchgeschädigter Bäume immer wesentlich höher ist als bei ungeschädigten. Um über diesen wichtigen Befund eine sichere statistische Aussage machen zu können, wurde in den Monaten November und Dezember 1971, zusätzlich zu den in Tab. 3 angeführten Proben, noch eine Anzahl weiterer Nadeln aus Standorten mit unterschiedlichem SO_2 -Gehalt auf ihren SH-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse und ihre statistische Auswertung (HASELOFF & HOFFMANN 1965) enthält Tab. 4. Diese Tabelle zeigt, daß der SH-Gehalt von Bäumen aus Standorten mit hohem SO_2 -Gehalt im untersuchten Zeitraum November/Dezember viermal größer ist als in Nadeln aus Standorten mit nahezu SO_2 -freier Atmosphäre.

Aus den bisherigen Untersuchungen (Tab. 3) geht hervor, daß der SH-Gehalt zu 95–100% auf GSH und nur zu 0–5% auf CySH zurückzu-

Tabelle 3

GSH-, CySH-, GSSG- und CySSCy-Konzentrationen ($\mu\text{Mole/lg}$ Trockengewicht TG) in ungeschädigten (K) und rauchgeschädigten (I) Fichtennadeln. Extrakt: 2 g Frischgewicht ergeben 20 ml Extrakt.

Trockengewicht TG: 2 g Frischgewicht ergeben $0,780 \pm 0,048$ g TG.

Trockenrückstand TR des Extraktes: 2 g Frischgewicht ergeben

$$0,210 \pm 0,018 \text{ g TR.}$$

Umrechnungsfaktoren: $\mu\text{Mole/l}$ Extrakt = $\mu\text{Mole/lg}$ TG \times 39

$$\mu\text{Mole/l g TR} = \mu\text{Mole/lg TG} \times 3,7$$

Datum	Herkunft	Gesamt-SH	GSH	CySH	GSSG	CySSCy
16. 11.	K	0,524	0,445	—	—	—
22. 11.	K	0,487	0,389	0,011	0,091	0,017
29. 11.	K	0,613	0,563	—	—	0,006
6. 12.	K	0,760	0,583	0,024	—	—
10. 1.	K	0,768	0,700	0,032	0,058	0,015
21. 1.	K	0,995	0,816	0,019	0,054	0,007
Mittelwerte		0,692	0,583	0,014		
			97,7% *)	2,3% *)		
12. 11.	I	2,12	1,960	0,060	0,0	0,093
24. 11.	I	0,857	0,825	0,0	0,0	0,0
1. 12.	I	2,47	2,060	0,0	0,0	0,0
18. 1.	I	2,37	2,010	0,020	0,040	0,020
25. 1.	I	1,55	1,395	0,006	0,0	0,0
8. 2.	I	2,78	2,25	0,067	0,0	0,043
Mittelwerte		2,02	1,750	0,026		
			88,5% *)	1,5% *)		

*) % der bestimmten CySH+GSH-Menge (CySH+GSH = 100%).

Gebiet, doch sind diese Gasmengen noch immer relativ gering im Vergleich zu den bei künstlicher Begasung verwendeten.

Stark rauchgeschädigte Nadeln weisen einen um ca. 300% höheren SH-Gehalt im Filtrat auf, als Nadeln aus dem \pm abgasfreien Kontrollgebiet. Dies wird wieder durch eine Zunahme von GSH im gleichen Ausmaß bewirkt; das Signifikanzniveau liegt bei 0,5%. Auch gering geschädigte Nadeln aus dem Rauchschadensgebiet (u. a. auch von Bäumen aus der Großstadtatmosphäre von Graz) zeigen ebenfalls einen höheren Gehalt an wasserlöslichen SH-Gruppen als die Kontrollnadeln; hier liegt das Signifikanzniveau bei 5%. Die Fichtennadeln sprechen offensichtlich recht empfindlich auf höhere S-Angebote an, indem sie den Gehalt an wasserlöslichen SH-Verbindungen erhöhen.

Dies ist aber nicht unbedingt ein Kriterium für S-haltige Abgase, denn auch ein höheres S-Angebot im Bereich der Wurzeln führt ebenfalls zu einer Erhöhung S-haltiger organischer Verbindungen (vgl. u. a. ARORA & LUCHRA 1970). Ob nun der erhöhte SH-Gehalt in rauchgeschädigten Nadeln auf die S-haltigen Luftverunreinigungen direkt oder über S-Anreicherung im Boden infolge dieser Emissionen zurückzuführen ist, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden. Wahrscheinlich sind aber beide Möglichkeiten in Betracht zu ziehen.

Wieweit jahreszeitliche Unterschiede, altersbedingte und ökologische Einflüsse für den SH-Gehalt maßgebend sind, ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

Die Konzentration wasserlöslicher SH-Gruppen in Extrakten von Fichtennadeln wurde kolorimetrisch mit DTNB und durch amperometrische Titration mit AgNO_3 bestimmt. Weiters wurde die Stabilität der SH-Gruppen in Fichtennadelextrakten untersucht.

Durch Trennung mit einer Anionenaustauschersäule (DEAE Sephadex A 25) konnten die Sulfhydrylkomponenten im Eluat bestimmt werden. Es handelt sich um Cystein bzw. Glutathion, der Anteil beträgt 0–5% bzw. 95–100%. Sulfit, das ebenfalls mit DTNB positiv reagiert, konnte in Filtraten rauchgeschädigter Fichten nicht nachgewiesen werden.

Der Gesamt-SH-Gehalt in rauchgeschädigten Fichten ist bis zu 4 mal so hoch wie in Fichten aus abgasfreien Gebieten, wobei sich am Verhältnis der einzelnen Komponenten zueinander nichts ändert.

6. Summary

The concentration of watersoluble SH-groups in extracts of spruce-needles was determined by colorimetric way with DTNB and amperometric titration with AgNO_3 . Besides the stability of SH-groups in extracts of

spruce-needles was examined. By separation with DEAE Sephadex A 25 the sulfhydryl components could be determined. They are cysteine and glutathione and its proportion is 0—5% : 95—100%. Sulphite also showing positive reaction with DTNB never could be found in the filtrates. Even not in those of gasdamaged trees.

The whole SH-content of fumigated spruces can be four times higher than in trees of regions with clean air without any altering of the relation of both components.

7. Schrifttum

- ARORA S. K. & LUCHRA Y. P. 1970. Metabolism of Sulfur Containing Amino Acids in Phaseolus Aureus Linn. — Z. Pflanzenernähr. 126: 151—158.
- COLE E. D., STEIN W. H., MOORE S. 1958. On the Cysteine Content of Human Haemoglobin. — J. biol. Chem. 233: 1359—1363.
- ELLMAN G. L. 1959. Tissue Sulfhydryl Groups. — Arch. Biochem. Biophys. 82: 70—77.
- FALLER N. & HÖFNER W. 1968. Schwefelassimilation durch zerkleinertes Pflanzenmaterial nach $^{35}\text{SO}_2$ -Begasung. — Z. Pflanzenernähr. 121: 111—116.
- GRILL D. 1972. Optische Veränderungen in Homogenisaten SO_2 -geschädigter Fichtennadeln. — Environm. anal. Chem. 1: 293—300.
- HÄRTEL O. 1960. Über neuere Erfahrungen mit dem „Trübungstest“, insbesondere seine Eignung zur forlaufenden Kontrolle von Abgasschäden. — Der Forst- u. Holzwirt 15, Heft 13.
- HASELOFF O. W. & HOFFMANN H. J. 1965. Kleines Lehrbuch der Statistik. — Berlin.
- HEGNAUER R. 1962. Chemotaxonomie der Pflanzen. — Basel, Stuttgart.
- KATZ M. & MCCALLUM 1952. The Effect of Sulfurdioxide on Conifers. — In: McCABE L. Air Pollution: 84—96. — New York—Toronto—London.
- MAPSON L. W. 1959. Enzyme Systems Associated with the Oxidation and Reduction of Gluthatione in Plant Tissues. — In: Gluthatione, Biochemical Society Sympose.
- OLSEN R. A. 1957. Absorption of Sulfur Dioxide from the Atmosphere by Cotton Plants. — Soil Sci. 84: 107—111.
- RACKER E. 1951. The Mechanism of Action of Glyoxalase. — J. biol. Chem. 190: 685—696.
- STOKLASA J. 1923. Beschädigungen der Vegetation durch Rauchgase und Fabriksexhalationen. — Berlin.
- THOMAS M. D., HENDRICKS R. H., COLLIER T. R. & HILL G. R. 1943. The Utilization of Sulphate and Sulfur Dioxide for the Sulfur Nutrition of Alfalfa. — Plant Physiol. 18: 345—371.
- — & HILL G. R. 1944. Some Chemical Reactions of Sulfur Dioxide after Absorption by Alfalfa and Sugar Beets. — Plant Physiol. 19: 212—226.

- WEIGL J. & ZIEGLER H. 1962. Die räumliche Verteilung von $^{35}\text{SO}_2$ und die Art der markierten Verbindungen in Spinatblättern nach Begasung mit $^{35}\text{SO}_2$. — *Planta* 58: 435–447.
- WIELER A. 1905. Untersuchungen über die Einwirkung schwefeliger Säure auf die Pflanzen. — Berlin.
- WILLAND T. H., DOSE K., PFLEIDERER G. 1955. Die enzymatische Bestimmung des Glutathions. — *Biochem. Z.* 326: 442–445.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn](#)

Jahr/Year: 1973

Band/Volume: [15_1_2](#)

Autor(en)/Author(s): Grill Dieter, Esterbauer Hermann

Artikel/Article: [Quantitative Bestimmung wasserlöslicher Sulfhydrylverbindungen in gesunden und SO₂-geschädigten Nadeln von *Picea abies*. 87-101](#)