

Phyton (Austria)	Vol. 19	Fasc. 1—2	103—112	2. 11. 1978
------------------	---------	-----------	---------	-------------

Die Wirkung ultravioletter Strahlung auf den oxidativen Stoffwechsel von Innenepidermiszellen von *Allium cepa*

Von

Robert KARTUSCH*)

Mit 3 Abbildungen

Eingelangt am 30. Dezember 1977

The Effect of Ultraviolet Radiation on the Oxidative Metabolism of the Inner Epidermal Cells of *Allium cepa*

Abstract

Effects on respiration caused by small UV-doses have been studied on inner epidermal cells of *Allium cepa*. Small or no effects at all could be observed if these cells were only irradiated. However, oxygen uptake is significantly reduced if irradiated cells are treated with a mixture of amytal and cyanide. No irradiation effect is found if only one of these compounds is applied.

Exclusive of the dormancy period oxygen uptake of unirradiated cells was inhibited only to a small extent by amytal and cyanide. In the presence of these two inhibitors interaction with oxygen is possible, but only via extramitochondrial pathways. These pathways are mainly based on enzyme systems located in microbodies or microsomes. Therefore it is concluded that these systems are one of the main UV-sensitive sites in vegetative cells. This conclusion is supported by the fact that similar effects to UV-irradiation are induced by 1, 2, 3, -aminotriazole, a specific inhibitor for the catalase mainly located in microbodies. The seasonal changes in the reaction to an amytal-cyanide-treatment furthermore point to activity changes within these extramitochondrial systems during the storage period.

Zusammenfassung

An der Innenepidermis von *Allium cepa* wurde die Wirkung kleiner Dosen ultravioletter Strahlung auf die Atmung und den Sauerstoffverbrauch

*) Dr. Robert KARTUSCH, Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Wien, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, A-1010 Wien, Austria.

pflanzlicher Zellen untersucht. Bestrahlung allein erbrachte nur geringe oder überhaupt keine Wirkung. Wurden bestrahlte Zellen aber mit einer Kombination von Amytal und Cyanid behandelt, war der Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu unbestrahlten signifikant vermindert. Keine solche durch Bestrahlung induzierte Verringerung konnte bei Anwendung eines der beiden Inhibitoren allein beobachtet werden.

Abgesehen vom absoluten Ruhestadium war bei unbestrahlten Präparaten der Sauerstoffverbrauch bei Behandlung mit Amytal und Cyanid nur wenig gehemmt. In Anwesenheit der beiden Inhibitoren ist Sauerstoffverbrauch aber nur über extramitochondriale Wege möglich. Dafür kommen in diesen Zellen hauptsächlich Enzymsysteme in Frage, die in Microbodies oder in Mikrosomen lokalisiert sind. Die Ergebnisse erlauben es daher, diese Enzymsysteme als Hauptangriffspunkt ultravioletter Strahlung in vegetativen Zellen anzusprechen. Dieser Befund wird weiterhin dadurch gestützt, daß es möglich ist, strahlungsähnliche Effekte auch durch 1, 2, 3-Aminotriazol, einem spezifischen Inhibitor der hauptsächlich in Microbodies lokalisierten Katalase, auszulösen. Die im Laufe der Lagerungsperiode verschiedene Auswirkung einer kombinierten Amytal- und Cyanidbehandlung auf den Sauerstoffverbrauch weisen ferner auf entwicklungsphysiologisch bedingte Aktivitätsänderungen und -verschiebungen innerhalb dieser extramitochondrialen Enzymsysteme hin.

1. Einleitung

Ultraviolette Strahlung ist in weiten Bereichen biologisch wirksam, die von morphologischen Wirkungen auf das Wachstum bis zu Schäden im genetischen Bereich reichen. Abgesehen von der Beeinflussung der Nukleinsäuren im genetischen Bereich durch kurzwellige Strahlung um 250 nm, die besonders durch die Arbeiten von SETLOW & SETLOW 1962, SETLOW & CARRIER 1963 aufgeklärt wurden, ist bei anderen der Wirkungsmechanismus, der vom photochemischen Primärereignis bis zum beobachtbaren Ergebnis führt, noch weitgehend unbekannt. Insbesondere ist die Wirkung auf stoffwechselphysiologische Vorgänge unaufgeklärt und wird in der Literatur heute kaum noch erwähnt. Einerseits liegt dies wohlwohl an der allgemeinen Schwierigkeit, die die Bearbeitung von untereinander abhängigen Prozessen, wie es Stoffwechselwege nun einmal sind, bereitet, andererseits auch an der reinen physikalischen Beherrschung der Versuchsanordnung überhaupt, da es gerade im ultravioletten Bereich nicht leicht ist, monochromatische Strahlung ausreichender Intensität zu erzeugen, und man vielfach nur auf das volle Emissionsspektrum eines Quecksilberdampfbrenners angewiesen ist.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluß ultravioletter Strahlung auf die Atmung untersucht, da von *Allium cepa*-Innenepidermiszellen ein Befund vorliegt, der eine Beeinträchtigung der Zellatmung durch UV-

Bestrahlung vermuten ließ. In bestrahlten Innenepidermiszellen unterbleibt nämlich die Reduktion von Tetrazoliumsalzen, was auf eine Beeinträchtigung der Reduktionsequivalente liefernden Dehydrogenasen schließen lässt (KARTUSCH 1974). In der Literatur wird aber bisher der Einfluß ultravioletter Strahlung auf die Atmung als eher gering beschrieben (HAGEN & LANGENDORF 1960). Der Sauerstoffverbrauch pflanzlicher Zellen kann aber nicht nur auf oxidativen Prozessen, wie sie normal in Mitochondrien ablaufen, sondern teilweise auch auf der Tätigkeit verschiedener extramitochondrialer Enzymsysteme beruhen (ELSTNER & KONZE 1976). Daher besteht im Prinzip die Möglichkeit, daß Schäden, die in einem Zellkompartiment gesetzt werden, durch die Tätigkeit eines anderen, nicht betroffenen, überdeckt werden. Wenn man daher genauere Aussagen über einen Bestrahlungseffekt und über dessen Wirkungsort erzielen will, ist es notwendig, gleichzeitig mit Inhibitoren zu arbeiten, die den einen oder anderen Stoffwechselweg spezifisch hemmen.

Unter dem Gesichtspunkt der Inhibitorspezifität ist es einfacher, die mitochondriale Atmung zu hemmen, da hier verschiedene Inhibitoren vorliegen, deren Angriffspunkt in der Atmungskette genau bekannt ist. Zu diesem Zweck wurden Amytal und Kaliumcyanid herangezogen, die sowohl einzeln als auch miteinander kombiniert angewendet wurden. Das Überleben der Innenepidermiszellen und die Wirkung dieser Inhibitoren wird bei KARTUSCH 1976 beschrieben. Außerdem muß einleitend noch darauf hingewiesen werden, daß es hier nicht um die Wirkung großer, letale Schäden setzender, sondern kleiner, subletaler Strahlendosen geht.

2. Material und Methode

Als Versuchsmaterial diente die innere Epidermis der Schuppenblätter von *Allium cepa*. Das Material stammte aus den Vegetationsperioden 1975, 1976 und 1977, einzelne Sorten konnten direkt vom Erzeuger sortenrein bezogen werden. Die Versuche wurden in den jeweils der Ernte folgenden Monaten September bis März durchgeführt. Bis zur Verwendung wurden die Zwiebeln bei 5° C gelagert. 1976 standen erstmals auch bereits im Juni Erntereife erlangende Frühsorten zur Verfügung.

Die Bestrahlung wurde mit dem ungefilterten Licht einer Quecksilberdampf-Entladungslampe durchgeführt (Silvania germicidal lamp G8T5 U.S.A.). Der Energiefluß (gemessen mit einer Thermosäule Kipp & Zonen) betrug im UV-Bereich unter 400 nm in der Bestrahlungsebene 3 W/m². Die Bestrahlungsdauer wurde zwischen 10 und 13 s variiert, was eine Dosis von 30—40 J/m² ergibt. Diese Strahlendosis verursachte in den Zellen keine nach außen hin erkennbaren Schädigungen. Bis zu einem Zeitraum von 6 bis 7 Tagen konnten in bestrahlten Präparaten keine abgestorbenen Zellen beobachtet werden.

Die Gewinnung der Präparate ist bei KARTUSCH 1976 beschrieben. Die Messung des Gasaustausches erfolgte mit der Warburg-Methode, die Durchführung ist ebenfalls bei KARTUSCH 1976 beschrieben. Die Versuchstemperatur betrug 25° C. Die Präparate wurden stets direkt in die betreffenden Inkubationslösungen in den Warburgkölbchen gebracht, die Messungen begannen nach einem Zeitraum von 45 min, der für das Zusammensetzen von Kolben und Manometern und für den Temperaturausgleich benötigt wurde. Der Sauerstoffverbrauch wurde über einen Zeitraum von 20—24 Stunden verfolgt. Da die einzelnen Versuchsansätze stets einen identischen Satz von Präparaten enthielten, waren die innerhalb des einzelnen Versuchs erhaltenen Werte untereinander unmittelbar vergleichbar; eine Umrechnung auf eine Bezugsgröße erübrigte sich daher. Die Abbildungen geben die tatsächlich gemessenen Werte wieder.

Als Inhibitoren kamen KCN in einer Konzentration von 2×10^{-6} M/l, Amytal (Isoaethylamylbarbitursäure, Na-Salz; Serva) in einer Konzentration von 5×10^{-3} M/l, sowie 1, 2, 3-Aminotriazol (Koch-Light Lab.) in einer Konzentration von 2×10^{-3} M/l zur Anwendung. Die Konzentrationen waren so gewählt, daß innerhalb des Versuchszeitraums keine letalen Schädigungen der Zellen erfolgten. Alle Stoffe wurden in Leitungswasser gelöst, nach Zusammenstellen der Stoffkombinationen wurde der pH-Wert durch Hinzufügen kleiner Mengen von 1 N H₂SO₄ auf 7.0 eingestellt.

3. Ergebnisse

Abgesehen von einem kurzen Zeitraum nach der Ernte, in dem eine höhere Strahlenempfindlichkeit besteht, wird die Atmung der Innenepidermiszellen durch ultraviolette Bestrahlung wenig beeinflußt. Im allgemeinen tritt nur eine leichte Hemmung des Sauerstoffverbrauchs ein (Fig. 1, A—C). Die CO₂-Abgabe ist ebenfalls leicht reduziert, der respiratorische Quotient bestrahlter Präparate ist jedoch leicht höher als der unbestrahlter.

Die Reaktion auf eine Hemmung der mitochondrialen Atmung durch Amytal und Cyanid variiert, da sie von der Dauer der Lagerungsperiode abhängig ist. Vor und im Ruhestadium war die Sauerstoffaufnahme vermindert, am stärksten im absoluten Ruhestadium der Zwiebeln, etwa Dezember. Nach Beendigung des Ruhestadiums war die Hemmung geringer und verschwand schließlich ganz; bei austreibenden Zwiebeln wurde durch eine Inhibitorbehandlung die Sauerstoffaufnahme sogar erhöht. Deutlich beeinflußt wurde auch die CO₂-Abgabe, die nach einer anfänglichen Steigerung stark reduziert wurde, wobei der respiratorische Quotient auf Werte unter 1,0 sank, während der der unbehandelten Kontrollen immer über 1,0 lag. Werden nun bestrahlte Präparate mit einer Kombination von Amytal und Cyanid behandelt, so wird der Sauerstoffverbrauch bedeutend herabgesetzt (Fig. 1A, C). Die Hemmung setzt zwar nicht sofort am Beginn der

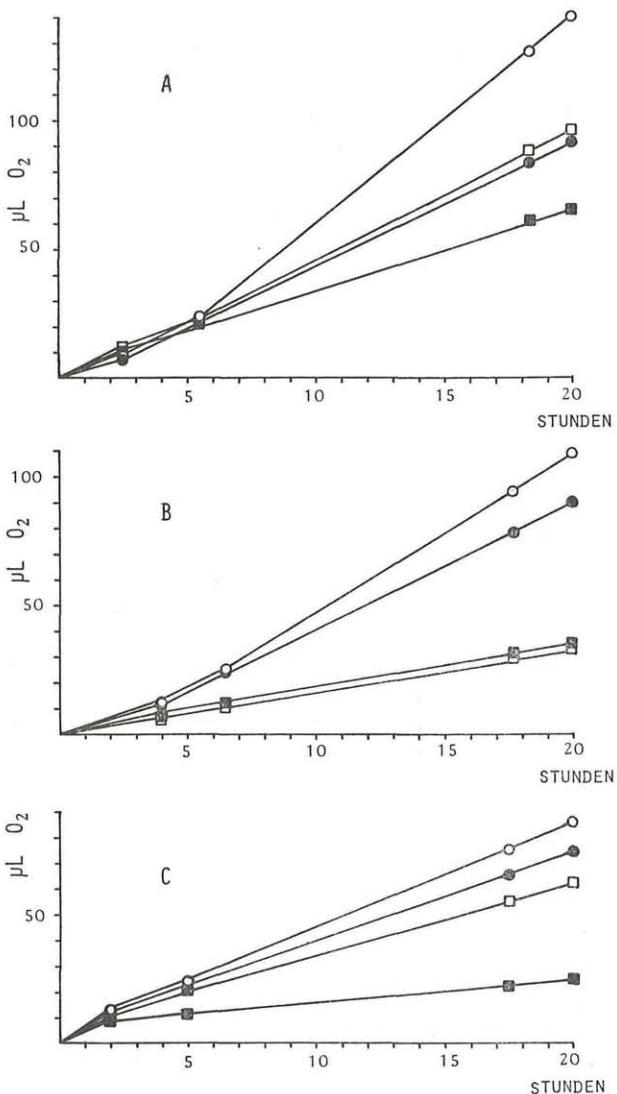


Fig. 1. Sauerstoffverbrauch nach UV-Bestrahlung (●), bei Behandlung mit Amytal und Cyanid (□), nach UV-Bestrahlung und Behandlung mit Amytal und Cyanid (■), und der unbehandelten Kontrolle (○). A): Frisch geerntete Zwiebeln (Holländische Sorte, Versuchsdatum 6. 10. 76), B): Ruhende Zwiebeln (cv. 'Empire', Versuchsdatum 9. 12. 77), C): Verhalten nach Beendigung des Ruhestadiums (cv. 'Topaz', Versuchsdatum 7. 1. 1976)

Behandlung ein, bereits nach wenigen Stunden ist aber die Sauerstoffaufnahmerate merklich verringert. Das Ausmaß dieser UV-induzierten Verringerung ist dort umso größer, je geringer bei unbestrahlten Präparaten die hemmende Wirkung von Amytal und Cyanid ist. Je stärker die Wirkung von Amytal und Cyanid allein ist, umso geringer ist auch ein UV-Effekt, wie dies bei Zwiebeln im Ruhestadium der Fall ist (Fig. 1 B). Mit der Hemmung der Sauerstoffsauftnahme ist auch eine gleichlaufende Verringerung der CO_2 -Abgabe verbunden.

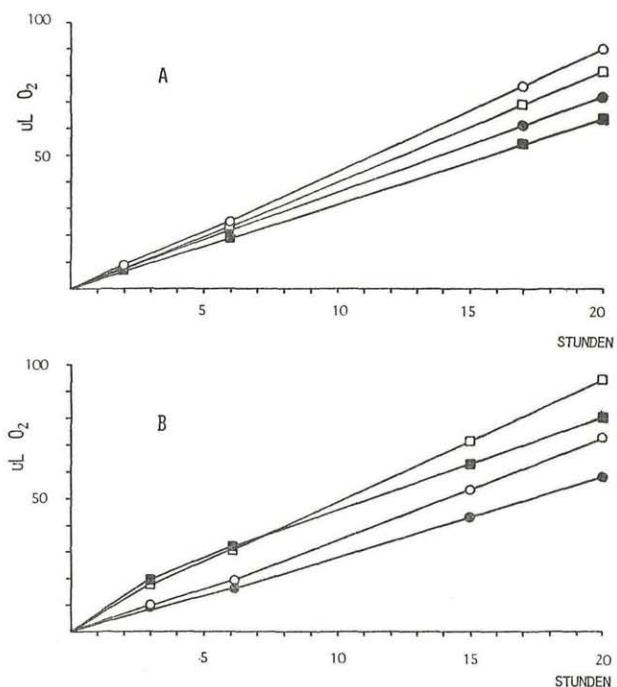


Fig. 2. Sauerstoffverbrauch nach UV-Bestrahlung und getrennter Anwendung von Amytal und Cyanid. A): Amytal (□), UV (●), UV und Amytal (■), und Kontrolle (○), B): Cyanid (□), UV (●), UV und Cyanid (■), und Kontrolle (○).

Bei mikroskopischer Überprüfung am Ende des Versuchs erwiesen sich die UV-bestrahlten, inhibitorbehandelten Präparate als noch lebend, zeigten aber schon nekrotische Erscheinungen wie verlangsamte bzw. sistierte Plasmastromung oder das Auftreten netzförmiger Plasmakonfigurationen.

Die durch ultraviolette Bestrahlung hervorgerufene Hemmung der Sauerstoffsauftnahme trat aber nur dann auf, wenn diese beiden Inhibitoren

kombiniert zur Anwendung gelangten. Bei einer nachfolgenden Behandlung mit Amytal oder Cyanid allein konnte im Vergleich zu unbestrahlten Präparaten nur eine leichte Verringerung der Sauerstoffaufnahme festgestellt werden (Fig. 2A, B). Bemerkenswert ist weiterhin, daß diese UV-induzierte Hemmung bereits durch relativ kleine Strahlendosen ab 30 J/m^2 hervor-

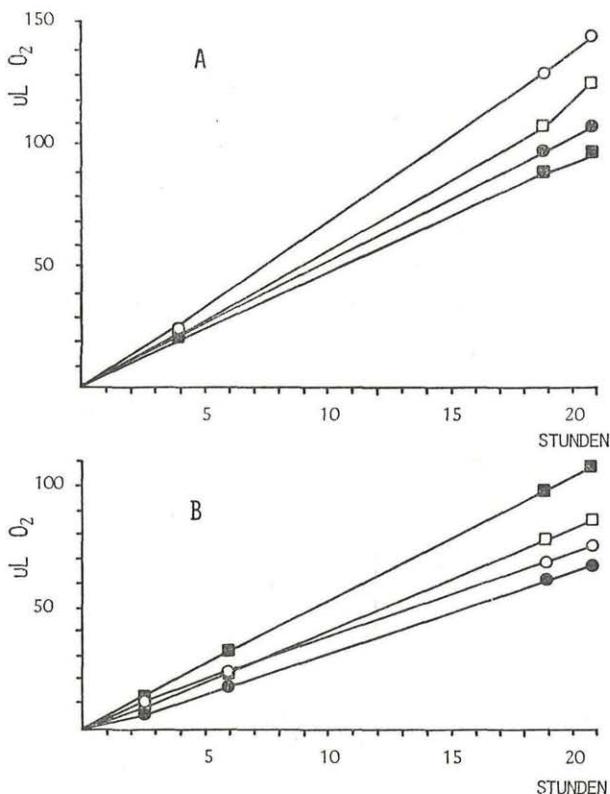


Fig. 3. Sauerstoffverbrauch bei Einwirkung von Aminotriazol (●), Amytal und Cyanid (□), Aminotriazol kombiniert mit Amytal und Cyanid (■), und der unbehandelten Kontrolle (○). A): Präparate von ruhenden Zwiebeln (Nov. 1976). B): Präparate von frühgetriebenen Zwiebeln (Jan. 1977)

gerufen wird. Die Dosisabhängigkeit ist außerdem sehr gering, der Effekt kann durch eine Erhöhung der Dosis (durch Verlängerung der Bestrahlungszeit) nicht mehr gesteigert werden.

Parallelen zu Ultraviolett hinsichtlich dieser Hemmwirkung und der jahreszeitlich verschiedenen Empfindlichkeit besitzt auch ein chemischer Stoff, nämlich 1, 2, 3-Aminotriazol, das auch durch seine herbiziden Eigen-

schaften bekannt ist. Zusatz dieses Hemmstoffs zu Amytal und Cyanid bewirkt ebenfalls eine Hemmung der Sauerstoffaufnahme, dies ist aber nur bei frisch geernteten Zwiebeln zu beobachten. Im Ruhestadium verschwindet dieser Effekt, bei austreibenden Zwiebeln bewirkt Aminotriazol — im Gegensatz zu UV — im Verband mit Amytal und Cyanid sogar eine Steigerung der Sauerstoffaufnahme (Fig. 3A, B).

4. Diskussion

Zum Verständnis der eben beschriebenen Ergebnisse ist es nötig, zunächst einmal die Wirkungen von Amytal und Cyanid zu erläutern. Amytal hemmt, ähnlich wie Rotenon, die NADH-oxidierenden Flavoproteine der Atmungskette. Cyanid ist allgemein als Inhibitor der Cytochromoxidase bekannt, eine Hemmung wird bereits durch sehr geringe Konzentrationen erreicht.

Pflanzliche Mitochondrien besitzen nun besondere Eigenschaften, die es ermöglichen, sowohl eine Amytal- als auch eine Cyanid-Hemmung zu umgehen. Eine davon ist die Fähigkeit zur Oxidation von extramitochondrialem NADH, wobei diese Elektronen hinter dem Ubichinon in die Atmungskette einmünden. Auf diese Weise kann ein Amytal-Block umgangen werden. Die zweite hervorstechende Besonderheit ist der Besitz eines Cyanid-insensitiven Nebenwegs der Endoxidation, der am Ubichinon von der Atmungskette abzweigt (STOREY 1976) und bei Hemmung der Cytochromoxidase durch Cyanid die Elektronen über eine noch nicht näher bekannte Endoxidase auf Sauerstoff überträgt (Lit. bei SOLOMOS 1977). Daraus ergibt sich, daß die pflanzliche Atmungskette nur dann vollständig gehemmt ist, wenn die beiden Inhibitoren kombiniert zur Anwendung kommen.

Wenn aber der Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit von Amytal und Cyanid nicht unterbunden ist, können nur extramitochondriale Systeme dafür verantwortlich sein. In nicht grünen pflanzlichen Geweben kommen dafür vor allem Enzymsysteme in Frage, die in Microbodies oder in „Mikrosomen“ lokalisiert sind. Microbodies enthalten Flavinsysteme, die durch Oxidation von Substraten wie α -Hydroxisäuren oder α -Aminosäuren mit Sauerstoff direkt H_2O_2 erzeugen und zeichnen sich vor allem durch den Besitz von Katalase aus. Genau ist ihre Rolle nur bei der sog. „Photorespiration“ und bei der Umwandlung von Fett in Kohlehydrate, dem sog. Glyoxylsäurezyklus, bekannt, sie konnten aber auch in einer Vielzahl von nicht grünen und nicht Fett speichernden Geweben nachgewiesen werden (HUANG & BEEVERS 1971, HUANG 1973). Ein zweiter Bereich, in dem Elektronenübertragung auf Sauerstoff möglich ist, sind die sog. „Mikrosomen“. Der Begriff wurde von CLAUDE für eine nach differentieller Zentrifugation erhaltene subzelluläre Fraktion geprägt und ist mehr biochemisch als cytologisch definiert (DE DUVE 1971). Vorwiegend sind hauptsächlich NADH- und NADPH oxidierende Flavinsysteme und Cytochrome des

b-Typs enthalten (ISHIMARU & YAMAZAKI 1977). Daneben findet man in dieser Fraktion auch den Hauptteil der sog. „mixed-function“-Oxidase-Aktivität (RICH & LAMB 1977).

Wenn nun in UV-bestrahlten Präparaten durch Behandlung mit einer Amytal-Cyanid-Kombination der Sauerstoffverbrauch stark gehemmt wird, so ist dies ein Zeichen dafür, daß ein Hauptangriffspunkt ultravioletter Strahlung in diesen extramitochondrialen Bereichen — und nicht nur im genetischen Bereich — liegt. Die Tatsache, daß bei alleiniger Anwesenheit von Amytal oder Cyanid diese Hemmung nicht auftritt, stützt diesen Befund, da bei Abwesenheit eines der beiden Inhibitoren immer ein Elektronenfluß über mitochondriale Wege offen ist. Die Ähnlichkeit eines Bestrahlungseffekts mit einer Aminotriazolwirkung deutet dabei auf die in den Microbodies lokalisierten Enzymsysteme hin, da der Hauptteil der durch Aminotriazol gehemmten Katalase ebenfalls dort zu finden ist. Darüber hinaus müssen auch außerhalb der Microbodies Angriffspunkte von UV vorliegen, da bei austreibenden Zwiebeln sich UV und Aminotriazol verschieden verhalten. Eine genauere Aussage über UV-Wirkungen wird aber dadurch erschwert, daß die Bestrahlung mit dem vollen Quecksilberemissionsspektrum erfolgte und somit keine Aussagen über die Wellenabhängigkeit dieses Effekts gemacht werden können. Sowohl dieser Befund als auch die innerhalb der Lagerungsperiode sich verändernde Wirkung einer kombinierten Behandlung mit Amytal und Cyanid deuten aber noch auf entwicklungsphysiologisch bedingte Aktivitätsänderungen oder Aktivitätsverschiebungen innerhalb dieser extramitochondrialen Systeme hin. Änderungen im Atmungsverhalten pflanzlicher Gewebe, die diese Möglichkeit ebenfalls nahelegen, konnten beispielsweise auch von AUGSTEIN 1962 an *Ficaria* oder von KOLLÖFFEL & VAN LOON-LIEVE 1975 an *Iris* beobachtet worden.

Literatur

- AUGSTEN H. 1962. Über die Beziehungen zwischen dem Entwicklungsrythmus von *Ficaria verna* Huds. und den Veränderungen einiger Stoffwechselgrößen in Bulbillen und Wurzelknollen. — Beitr. Biol. Pflanzen 37: 85—105.
- DE DUVE C. 1971. Tissue fractionation. Past and present. — J. Cell Biol. 50: 20d—55d.
- ELSTNER E. F. & KONZE J. 1976. Wege der Sauerstoffaktivierung in verschiedenen Kompartimenten von Pflanzenzellen. — Ber. dtsch. bot. Ges. 89: 335—348.
- HAGEN U. & LANGENDORFF H. 1960: Einfluß der ionisierenden und der UV-Strahlung auf die Atmung. In: Handbuch der Pflanzenphysiologie (W. RUHLAND, Ed.) vol. 12 (2): 334—346. — Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- HUANG A. H. C. 1973. Lokalisation of enzymes within microbodies. — J. Cell Biol. 58: 379—389.

- HUANG A. H. C. & BEEVERS H. 1971. Isolation of microbodies from plant tissues. — Plant Physiol. 48: 637—641.
- ISHIMARU A. & YAMAZAKI J. 1977. The carbon monoxide binding hemoprotein reducible by hydrogen peroxide in microsomal fractions of pea seeds. — J. biol. Chem. 252: 199—204.
- KARTUSCH R. 1974. Wirkung kleiner UV-Dosen auf die Reduktion von Nitroblau-Tetrazoliumchlorid in Epidermiszellen von *Allium cepa* L. — Protoplasma 81: 383—392.
- 1976. Physiologische und cytomorphologische Effekte von Cyanid und anderen Inhibitoren an Inneneipidermiszellen von *Allium cepa* L. — Protoplasma 89: 291—303.
- KOLLÖFFEL C & M. P. VAN LOON-LIEVE 1975. Respiration rate and mitochondrial activity in *Iris* bulbs. — Physiol. Plant. 35: 328—332.
- RICH P. R. & LAMB C. L. 1977. Biophysical and enzymological studies upon the interaction of trans cinnamic acid with higher plant microsomal cytochromes P-450. — Eur. J. Biochem. 72: 353—360.
- SETLOW R. B. & SETLOW J. K. 1962. Evidence that ultraviolet induced thymine dimers in DNA cause biological damage. — Proc. nat. Acad. Sci. U. S. 48: 1250—1257.
- SETLOW R. B. & CARRIER W. L. 1963. Identification of ultraviolet induced thymine dimers in DNA by absorbance measurements. — Photochem. Photobiol. 2: 49—57.
- SOLOMOS T. 1977. Cyanide-resistant respiration in higher plants. — Ann. Rev. Plant Physiol. 28: 279—297.
- STOREY B. T. 1976. Respiratory chain of plant mitochondria. XVIII. Point of interaction of the alternate oxidase with the respiratory chain. — Plant Physiol. 58: 521—525.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1978

Band/Volume: [19_1_2](#)

Autor(en)/Author(s): Kartusch Robert

Artikel/Article: [Die Wirkung ultravioletter Strahlung auf den oxidativen Stoffwechsel von Innenepidermiszellen von Allium cepa. 103-112](#)