©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Phyton (Austria)	Vol. 20	Fasc. 3—4	251—259	30. 9. 1980

Aus den Instituten für Pflanzenphysiologie sowie Biochemie der Universität Graz

Über das Ascorbinsäuresystem in *Larix* und *Aesculus*

Von

Dieter GRILL *), Hermann ESTERBAUER **) und Ruth WELT *)

Mit 3 Abbildungen

Eingelangt am 23. November 1979

Key words: *Aesculus*, *Larix*, ascorbic acid, dehydroascorbic acid, ascorbic acid oxidase, dehydroascorbic acid reductase.

Summary

Notes on the Ascorbic Acid System in *Larix* and *Aesculus*

The ascorbic acid system of the deciduous trees *Larix* and *Aesculus* is being reported in this paper and compared with that of the evergreen spruce. In principle, one can observe some agreement of the ascorbic acid maxima and minima which appear during the summer months. Seasonal variations of the ascorbic acid are certainly not due to a shift of the ascorbic-dehydroascorbic balance but must be attributed to an increased synthesis or degradation resp. The dehydroascobic acid content never exceeds 10 per cent of the ascorbic acid content. A seasonal increase of the ascorbic acid always accompanied by an increase of ascorbic acid oxidase and a decrease of dehydroascorbic acid reductase, indicates the close interaction (or cooperation) of the two enzymes. As a similar relation was found previously for spruce needles it appears that this interrelation in the ascorbic acid system is a more general phenomenon. The principle differences of ascorbic acid system between spruce and larch in autumn is being discussed.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird über das Ascorbinsäuresystem in den sommergrünen Bäumen *Larix* und *Aesculus* berichtet und mit dem der immergrünen Fichte verglichen. Es lassen sich prinzipielle Übereinstimmungen der Maxima und Minima während der Sommermonate erkennen. Die jahreszeitlichen Änderun-

*) Univ.-Doz. Dr. D. GRILL, Dr. R. WELT, Institut für Pflanzenphysiologie Universität Graz, A-8010 Graz, Schubertstraße 51 (Austria).

**) Univ.-Prof. Dr. H. ESTERBAUER, Institut für Biochemie, Universität Graz, A-8010 Graz, Schubertstraße 1 (Austria).

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

gen der Ascorbinsäure beruhen sicher nicht auf einer Verschiebung des Ascorbinsäure-Dehydroascorbinsäuregleichgewichtes, sondern werden auf eine erhöhte Synthese bzw. Abbau zurückgeführt. Der DAS-Gehalt beträgt rund 10% der Ascorbinsäure. Auch bei der Lärche läßt sich der bei Fichten gemachte Befund bestätigen, daß zwischen Ascorbinsäure und Ascorbinsäureoxidase bzw. Dehydroascorbinsäureductase eine Wechselwirkung besteht. Dabei verlaufen Ascorbinsäure bzw. Ascorbinsäureoxidase annähernd gleichsinnig, wogegen die Dehydroascorbinsäurereductase sich invers verhält. Die prinzipiellen Unterschiede zwischen Fichte und Lärche im Ascorbinsäuresystem im Herbst werden diskutiert.

1. Einleitung

Trotz zahlreicher Untersuchungen über Vorkommen, Biosynthese und Abbau von Ascorbinsäure in Pflanzen besteht über ihre tatsächliche Funktion im Stoffwechsel der Pflanze keine Klarheit. Manche Autoren (Avron 1960, Halliwell & Foyer 1976) nehmen an, daß die Ascorbinsäure in erster Linie eine Schutzsubstanz ist, die Zellen bzw. Zellorganellen vor toxischen Sauerstoffprodukten wie Wasserstoffperoxid, Superoxidradikal und Hydroxiradikal schützt. AS scheint auch weiters eine Rolle im Energiehaushalt der Chloroplasten (Elstner & Kramer 1973) bzw. im Fettsäuremetabolismus (Stumpf 1976) zu spielen.

Der Entwicklungszustand einer Zelle und ihr Ascorbinsäuregehalt stehen im engen Zusammenhang und allgemein ist junges Gewebe durch einen hohen und altes Gewebe durch einen niedrigen Ascorbinsäuregehalt gekennzeichnet (Metzner 1957, Mapson 1958, Franke 1968, Esterbauer, Grill & Welt 1980, u. a.). Franke 1958 bringt den hohen Ascorbinsäuregehalt junger Blätter mit dem erhöhten Angebot an Galacturonsäure für den Aufbau der Hemizellulosen in Zusammenhang, da neben Glucuronsäure auch die Galacturonsäure Precursor für die Ascorbinsäuresynthese ist. Eine große Bedeutung scheint die Ascorbinsäure aber auch für schon voll entwickelte Blätter zu haben. Dies geht unter anderem schon daraus hervor, daß sich das Ascorbinsäuresystem in immergrünen Pflanzen (z.B. *Picea abies*) nach einem festen Programm jahresperiodisch ändert und daß genetische und ökologische Faktoren (z.B. Standort) praktisch keinen Einfluß auf dieses Programm haben (Esterbauer, Grill & Welt 1980). Wir haben festgestellt, daß bei Fichtennadeln der Jahresgang von Ascorbinsäure sich weitgehend mit dem Jahresgang der Ascorbinsäureoxidase deckt, während die Dehydroascorbinsäurereduktase einen genau inversen Verlauf hat. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die Ascorbinsäure die Aktivität dieser beiden Enzyme so regelt, daß bei hohen Ascorbinsäurekonzentrationen der Abbau, bei niedrigen dagegen der Aufbau (aus Dehydroascorbinsäure) forciert wird. Der physiologische Sinn einer derartigen Kontrolle könnte darin liegen, daß dadurch extreme Änderungen des Ascorbinsäuregehaltes verhindert werden. Wir haben das Ascorbinsäuresystem nun auch in Larix decidua und Aesculus hippocastanum untersucht, um

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

festzustellen, ob auch in sommergrünen Pflanzen eine ähnliche Wechselwirkung zwischen Ascorbinsäure einerseits und Ascorbinsäure-Oxidase bzw. Dehydroascorbinsäure-Reductase andererseits besteht.

Abkürzungen

AS = Ascorbinsäure
DAS = Dehydroascorbinsäure
FG = Frischgewicht

2. Material und Methodik

Das Untersuchungsmaterial stammte aus dem Botanischen Garten von Graz bzw. seiner näheren Umgebung. Für die Untersuchung der Jahresgänge wurden Nadelproben von Kurztrieben einer ca. 100jährigen Lärche (*Larix decidua* MILL.) herangezogen, wobei die Probenahme jeweils an der gleichen Stelle des Baumes erfolgte, um den Einfluß verschiedener Belichtung auszuschließen. Analog wurden die Proben von einer ca. 50järigen Roßkastanie (*Aesculus hippocastanum* L.) gesammelt, wobei das jeweils älteste Blatt eines Zweiges analysiert wurde.

Die Aufarbeitung der Blätter und die Bestimmung der AS, DAS, AS-Oxidase und DAS-Reductase erfolgt so, wie schon früher (ESTERBAUER, GRILL & WELT 1980) für Fichtennadeln beschrieben wurde. Ascorbinsäure wurde kolorimetrisch mit Dichlorphenolindophenol bestimmt, während die DAS-Bestimmung auf FRANKE 1955 zurückgeht. Die Aktivitäten der AS-Oxidase bzw. DAS-Reductase wurden aus Acetontrockenpulver des zu untersuchenden Pflanzenmaterials ausgewertet.

Die Enzymaktivitäten sind in Units pro 1 g Frischgewicht angegeben, wobei 1 Unit jene Enzymmenge ist, die pro Minute 1 μMol AS oxidiert (AS-Oxidase) bzw. 1 μMol DAS (DAS-Reductase) reduziert.

3. Ergebnisse

Die Abb. 1 und 2 zeigen Jahresgänge von AS in Nadeln von *Larix* bzw. *Aesculus*. Unmittelbar nach dem Austrieb hatten die Blätter mit 1,68 mg/gFG bzw. 1,23 mg/gFG die höchsten AS-Werte. Mit fortschreitender Blattentwicklung nahm in beiden Fällen der AS-Gehalt ab und erreichte Anfang Juli mit 1,11 bzw. 0,85 mg/gFG ein Minimum. Dieses Minimum tritt auch dann auf, wenn man die unterschiedlichen Trockengewichtsanteile junger und ausgewachsener Nadeln berücksichtigt. Nach Überschreiten des Minimums, das nur wenige Tage anhielt, stieg die AS-Konzentration wieder schnell an und blieb dann während der Sommermonate bei ca. 1,3 mg/gFG. Bei Larix trat in dieser Zeit noch zusätzlich 1 Maximum Ende Juli, bei *Aesculus* Ende September auf. In den alternden Nadeln bzw. Blättern fiel schließlich der AS-Gehalt innerhalb eines Monats drastisch auf etwa 0,54 (Lärche) bzw. 0,84 mg/gFG (Roßkastanie).

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Bei Berücksichtigung des erhöhten Trockengewichtsanteiles (Abb. 1 u. 2) während der Phase der Alterung bzw. Vergilbung dieser sommergrünen Bäume würde die AS-Abnahme noch deutlicher aufscheinen.

Der DAS-Gehalt (Abb. 1 und 2) der Lärchen- und Roßkastanienblätter

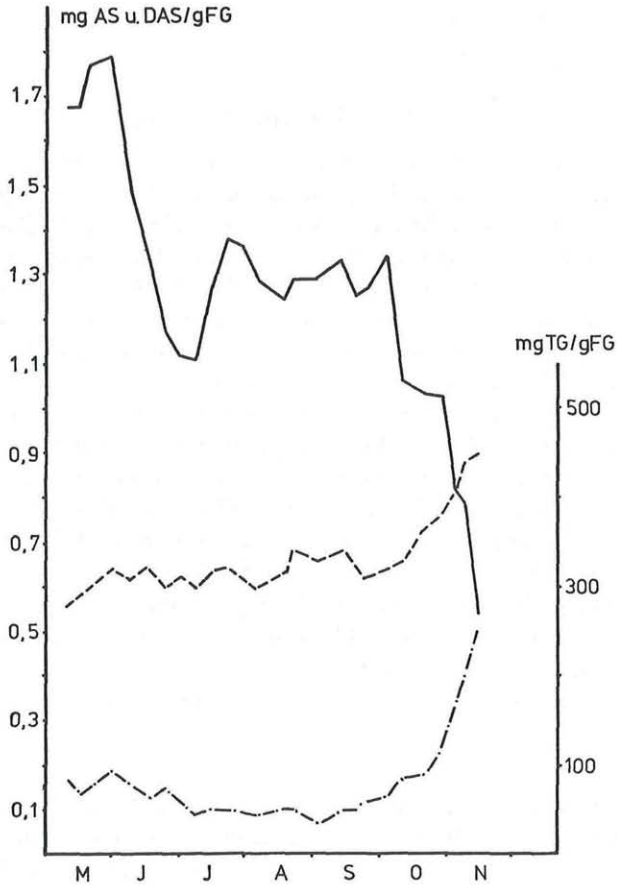

Abb. 1. Ascorbinsäure- und Dehydroascorbinsäuregehalt, sowie der Trockengewichtsanteil in Lärchennadeln während einer Vegetationsperiode. Angaben in mg pro 1 g Frischgewicht
———— AS, —.— DAS, — — — TG

lag vom Austrieb weg bis in den Sommer hinein bei ca. 10% der Ascorbinsäure und blieb in dieser Periode auch weitgehend bei etwa 0,14 mg/gFG unverändert. Im Herbst stieg gleichzeitig mit dem Abfall der AS die DAS beträchtlich an, so daß zur Zeit des Blattfalls 0,50 (Lärche) bzw. 0,48 mg/gFG (Roßkastanie) erreicht wurden.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Die Abb. 3 zeigt die Änderung der Aktivitäten der Enzyme AS-Oxidase und DAS-Reductase in Lärchennadeln vom Austrieb bis zum Abfall der Nadeln. Die AS-Oxidase hat unmittelbar nach dem Austrieb ihre höchste Aktivität (0,75 Units/1 g FG). Mit zunehmender Nadelentwicklung nahm die Aktivität dann bis Mitte Juli ab (0,38 U/gFG). Im weiteren Verlauf trat nochmals ein schwaches Maximum Anfang September auf und

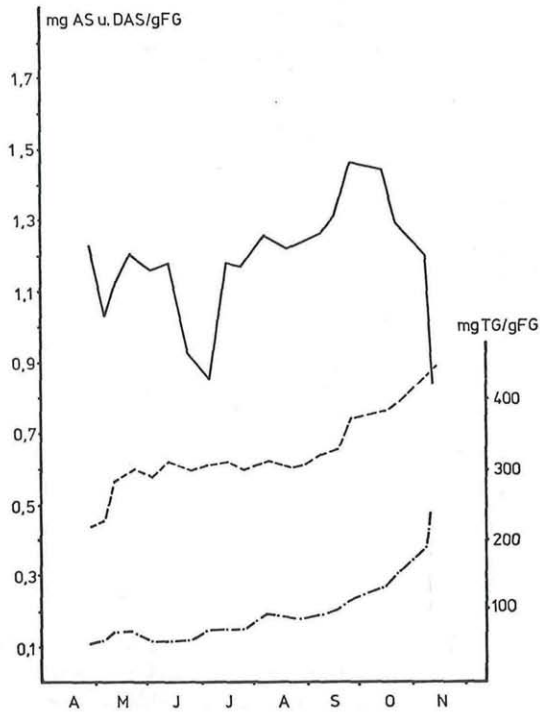

Abb. 2. Ascorbinsäure- und Dehydroascorbinsäuregehalt, sowie Trockengewichtsanteil in Roßkastanienblättern während einer Vegetationsperiode. Angaben in mg pro 1 g Frischgewicht
———— AS, —.— DAS, — — — TG

schließlich kam es zu einem starken Anstieg der Aktivität in den alternden Nadeln, der bis zum Nadelfall anhielt.

Der jahreszeitliche Verlauf der Aktivität der DAS-Reduktase war im wesentlichen invers zum Verlauf der AS-Oxidase. So stieg bei diesem Enzym, im Gegensatz zur AS-Oxidase, die Aktivität vom Austrieb weg (0,28 U/gFG) mit zunehmender Nadelentwicklung an und erreichte Anfang Juli die größte Aktivität (0,80 U/gFG). Bei alternden Nadeln fiel sie dann, wieder im Gegensatz zur AS-Oxidase, drastisch ab.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

4. Diskussion

Der Ascorbinsäuregehalt in Nadeln von *Larix* und *Aesculus* ändert sich von Frühjahr bis zum Spätherbst im Prinzip in gleicher Weise, wobei der Verlauf durch folgende charakteristischer Perioden gekennzeichnet ist: Frühjahrsmaximum, Sommerminimum, Sommermaximum, Herbstminimum. Da auch in diesjährigen Fichtennadeln die AS-Änderung im wesentlichen nach diesem Schema abläuft, scheint es sich um ein sowohl für sommergrüne als auch immergrüne Bäume gültiges Programm zu handeln. Bei der Fichte führt allerdings der Herbstabfall der AS zu einem Minimum,

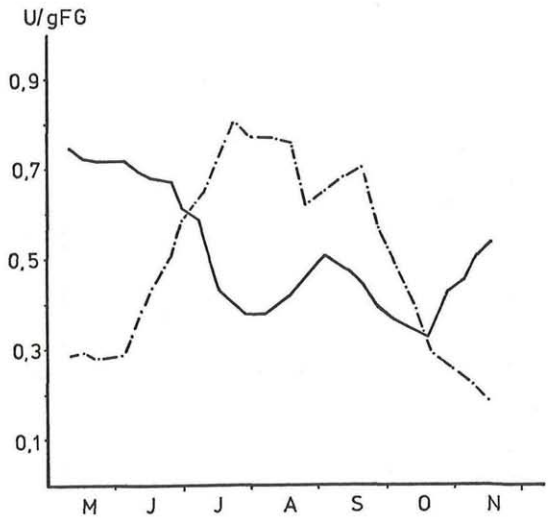

Abb. 3. Jahresgang der AS-Oxidaseaktivität sowie der DAS-Reductaseaktivität in Lärchennadeln (Units pro 1 g Frischgewicht)
_____ AS-Oxidase, —.— DAS-Reductase

und die oben genannten Perioden wiederholen sich im darauffolgenden Jahr. Ökologische, genetische und artspezifische Faktoren haben zweifellos einen Einfluß auf die Periodenlänge und auf die AS-Maxima- und Minimawerte, sie scheinen aber das Programm nur im Detail und nicht in den wesentlichen Grundzügen zu verändern. Die Änderungen der AS-Konzentration im Frühjahr und im Sommer beruhen sicher nicht auf einer Verschiebung des AS-DAS-Gleichgewichtes, sondern auf erhöhter de novo Synthese bzw. erhöhtem Abbau, da die DAS nur ca. 10% der Gesamtascorbinsäure ausmacht und da weiters Änderungen der AS-Konzentration nicht von Änderungen der DAS begleitet sind. Die Untersuchungen an *Larix* und *Aesculus* bringen weitere Bestätigung eigener (Esterbauer, Grill & Welt 1980) und anderer (Metzner 1957, Mapson 1958, Franke 1968

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

u. a.) Befunde, wonach das Jugendstadium durch hohen Ascorbinsäuregehalt gekennzeichnet ist, der dann mit zunehmender Reifung stark abfällt. In jungen Zellen verhindert Ascorbinsäure als starkes Antioxidans vermutlich sowohl die Einlagerung von Lignin in die Zellwand (Higuchi 1958) als auch den oxidativen Einbau von Indolylessigsäure (Betz 1963), die im Jugendstadium als Wachstumshormon für die Zellstreckung eine Rolle spielt. Für die Biosynthese der AS stehen gerade in jungen Zellen ausreichende Mengen der unmittelbaren Vorstufe, nämlich Galacturonsäure (Isherwood & Mapson 1961, Loewus, Wagner & Yang 1975) zur Verfügung, da diese Substanz im Jugendstadium in erhöhtem Maße für den Pektinaufbau bereitgestellt wird. Das Sommermaximum der AS, das bei Fichte und Lärche nur kurzfristig auftritt, bei Aesculus aber 2 Monate anhält, könnte mit einer geänderten Photosyntheseaktivität (Hoffmann 1962) in Zusammenhang stehen. Ob der starke Abfall der Ascorbinsäure im Herbst ausschließlich eine Folge der Alterung ist, ist fraglich, weil dieser drastische Abfall nicht nur bei *Larix* und *Aesculus* auftritt, sondern auch bei Nadeln von *Picea abies* und in diesem Fall sicher nicht einem Alterungsprozeß zuzuschreiben ist. Wahrscheinlicher scheint uns, daß der Abfall der AS im Herbst primär nicht alterungsbedingt, sondern die Folge einer für den Herbst typischen Stoffwechsellage ist. Der prinzipielle Unterschied zwischen den Immergrünen und Sommergrünen besteht darin, daß erstere Mechanismen besitzen, die diesen Abfall stoppen und noch vor dem Winter zu einem kräftigen Anstieg der AS führen, während bei letzteren dieser Mechanismus offenbar nicht existiert oder versagt. Dadurch führt bei den Sommergrünen die für den Herbst typische Stoffwechsellage direkt über die Alterung zum Tod. Über Abnahme der AS in sich verfärbenden Laubblättern hat früher auch schon Franke 1965 berichtet.

Der an Fichtennadeln erhobene Befund, daß zwischen AS einerseits und AS-Oxidase bzw. DAS-Reduktase andererseits eine Wechselwirkung besteht, bestätigt sich teilweise auch bei *Larix*, obwohl hier die Zusammenhänge wesentlich weniger deutlich sind. Vom Austrieb weg bis Ende August zeigen die Aktivitäten beider Enzyme einen inversen Verlauf d. h. wenn die Aktivität der DAS-Reduktase zunimmt, sinkt die Aktivität der AS-Oxidase ab. Der Kurvenverlauf der beiden Enzymaktivitäten ist auch weitgehend identisch mit deren Kurvenverlauf bei der Fichte (Esterbauer, Grill & Welt 1980). Ein prinzipieller Unterschied zwischen Fichte und Lärche ergibt sich im Verhalten der DAS-Reductase im Herbst. Während bei der Fichte die Aktivität dieses Enzyms vom September weg wieder ansteigt, was letztlich wieder zu einer Steigerung der AS-Menge führt, fällt bei der Lärche die Aktivität dieses Enzyms vom September weg bis zum Nadelfall. Das heißt, daß bei der Lärche im Herbst die Fähigkeit zur Regeneration der AS mehr und mehr schwindet, wodurch schließlich auch die für normalen Zellstoffwechsel wichtige Schutzfunktion der AS mehr und mehr ausfällt.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Die Erhöhung der AS-Oxidaseaktivität ist mit einem klimakterischen Atmungsanstieg älterer Blätter (EBERHARDT 1955, FISCHER 1961) und somit verstärkter Oxidaseaktivität in Verbindung zu bringen. Die durch verstärkte Oxidaseaktivität, verringerte Reduktaseaktivität sowie geringere Photosynthese verursachte eingeschränkte AS-Neusynthese führt zu einem DAS-Anstieg in den Lärchennadeln. Dieser ist auch in vergilbenden Roßkastanienblättern vorzufinden. Sicher führen auch Störungen in der Kompartimentierung, hervorgerufen durch die herbstlichen Abbauvorgänge in den Blättern zu einer Erhöhung der DAS, wodurch in vivo bestehende räumliche Trennungen von Substrat und Enzymen zusammenbrechen; z. B. ist die AS vor allem in Chloroplasten lokalisiert (FRANKE & HEBER 1964), die Oxidase hingegen an den Zellwänden (HONDA 1955, HALLAWAY, PHETEAN & TAGGART 1970). Durch die gestörte Kompartimentierung können substratfremde Enzyme die Ascorbinsäure oxidieren, wie Cytochromoxidase oder Phenoloxidasen (MAPSON 1958). Die hohe Aktivität der AS-Oxidase in jungen Nadeln wäre hingegen grundsätzlich in anderer Weise zu interpretieren. Es wäre nämlich denkbar, das in bestimmte Zellwandkomponenten (Pektine) auch Xylon und Lyxonsäuren eingebaut werden. Mit dieser Annahme würde die hohe Aktivität der AS-Oxidase in jungem Gewebe vermutlich zur Bereitstellung dieser Pentonsäuren aus der DAS dienen und es ist damit durchaus einleuchtend, daß die Aktivität dieses Enzyms mit zunehmender Reifung abnimmt. Für eine derartige Funktion der AS-Oxidase sprechen auch die Befunde, wonach dieses Enzym vorwiegend in den Zellwänden lokalisiert ist.

5. Schriftenverzeichnis

AVRON M. 1960. Photophosphorylation by Swiss-chard chloroplasts. — Biochem. Biophys. Acta 40: 257—272.

BETZ A. 1963. Ascorbinsäure, NADH, Cystein und Glutathion hemmen den durch Peroxidase katalysierten Abbau von β-Indolylessigsäure. — Z. Bot. 51: 424—433.

EBERHARD F. 1955. Der Atmungsverlauf alternder Blätter und reifender Früchte. — Planta 45: 57—67.

ELSTNER E. F. & KRAMER R. 1973. Role of the superoxide free radical ion in photosynthetic ascorbate oxidation and ascorbate mediated photophosphorylation. — Biochem. Biophys. Acta 314: 340—353.

ESTERBAUER H., GRILL D. & WELT R. 1980. Der jahreszeitliche Rhythmus des Ascorbinsäuresystems in Nadeln von *Picea abies*. — Z. Pflanzenphysiol. (im Druck).

FISCHER H. 1961. Über den Gaswechsel vergilbender Laubblätter. — Flora 150: 416—426.

FRANKE W. 1955. Ascorbinsäure. In: PAECH K. & TRACEY M. (Hg.), Moderne Methoden der Pflanzenanalyse Bd. II, 95—112. — Springer, Berlin—Göttingen—Heidelberg.

— 1965. Über den Vitamin-C-Gehalt der Herbstblätter. I. Mitt.: Der

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Vitamin-C-Gehalt bis zum Laubabwurf. — Z. Pflanzenphysiol. 53: 289—310.

FRANKE W. 1968. Der jahreszeitlich unterschiedliche Vitamin-C-Gehalt in Coniferennadeln als Folge von Ascorbinsäuresynthese und -abbau. — Z. Pflanzenphysiol. 60: 30—36.

— & HEBER U. 1964. Über die quantitative Verteilung der Ascorbinsäure innerhalb der Pflanzenzelle. — Z. Naturf. 19: 1146—1149.

HALLAWAY M., PHETHEAN P. D. & TAGGART J. 1970. A critical study of the intracellular distribution of ascorbate oxidase and a comparison of the kinetics of the soluble and the cell-wall enzyme. — Phytochemistry 9: 935—944.

HALLIWELL B. & FOYER C. H. 1978. Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. — Planta 139: 9—17.

HIGUCHI T. 1958. Studies on the biosynthesis of lignin. In: KRETZL K. & BILLEK G. (eds.). Proc. 4th. int. Congress of Biochemistry, Vienna 1958, Vol. II, 161—186. — Pergamon Press, London—New York—Paris—Los Angeles.

HOFFMANN P. 1962. Untersuchungen über Photosynthese und Atmung von Blättern verschiedenen Alters. — Flora 152: 622—654.

HONDA S. J. 1955. Ascorbic acid oxidase in barley roots. — Plant Physiol. 30: 174—181.

ISHERWOOD F. & MAPSON L. W. 1961. Biosynthesis of L-ascorbic acid in animals and plants. — Ann. N. Y. Acad. Sci. 92: 6—20.

LOEWUS F. A., WAGNER G. & YANG J. C. 1975. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants. — Ann. N. Y. Acad. Sci. 258: 7—23.

MAPSON L. W. 1958. Metabolism of ascorbic acid in plants: I. Function. — Ann. Rev. Plant Physiol. 9: 119—150.

METZNER H. 1957. Die Ascorbinsäure in der Pflanzenzelle. — Protoplasmatologia Bd. 2. B 2 b. — Springer, Wien.

STUMPF P. K. 1976. Lipid Metabolism. In: BONNER J. & VARNER J. E. (eds.), Plant Biochemistry. — Academic Press, New York—San Francisco—London.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1980

Band/Volume: 20_3_4

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

Artikel/Article: Über das Ascorbinsäuresystem in Larix und Aesculus. 251-259