Phyton (Austria)	Vol. 29	Fasc. 3 Sonderband Zillertal"	(163)-(185)	21. 11. 1989	
r nyton (Austria)	V01. 29	"Zillertal"	(103)-(103)	21. 11. 1909	

## Thiole, Ascorbinsäure, Pigmente und Epikutikularwachse in Fichtennadeln aus dem Höhenprofil "Zillertal"

Von

Edith BERMADINGER, Dieter GRILL und Helmut GUTTENBERGER

#### Mit 13 Abbildungen

#### Eingegangen am 8. Juni 1989

Key words: *Picea abies*, stress factors, thiols, ascorbic acid, pigment content, epicuticular waxes.

#### Summary

BERMADINGER E., GRILL D. & GUTTENBERGER H. 1989. Thiols, ascorbic acid, pigments and epicuticular waxes in needles from spruces in the altitude profile "Zillertal". – Phyton (Austria) 29 (3, Special issue "Zillertal"): (163)–(185), 13 figures. – German with English summary.

In the course of the "Höhenprofil Zillertal" physiological and structural investigations were performed on needles of three spruces (Picea abies [L.] KARST.) from three different altitudes (700 m, 1000 m, 1520 m above sea level). The investigations comprise the content of water soluble thiols, the main component of which is glutathione, the content of ascorbic acid and dehydroascorbic acid, the activity of the glutathione reductase, the pigment content and the structure of the epicuticular waxes. With the exception of the needle waxes all metabolites reveal pronounced seasonal variations. Before needle flushing the thiol content and the enzyme activity show a maximum, while the pigment content is lowest. None of the trees shows extreme and dramatic alterations due to natural or anthropogenic stress factors. However, concerning the sum of the investigations it is possible to differentiate between the three sites according to the impact of air pollutants. The tree of site 1 (700 m a.s.l.) reveals pronounced wax destructions, a low needle content of ascorbic acid and an increased thiol content in the needles of the upper crown. These symptoms indicate an influence of acidic pollutants, above all SO<sub>2</sub>. In spring (April) the needles of tree 2 show a very low enzyme activity and high xanthophyll /carotin ratios in the needle year 87. This

<sup>\*)</sup> Dr. E. BERMADINGER, Prof. Dr. D. GRILL, Mag. Dr. H. GUTTENBERGER, Institut für Pflanzenphysiologie, Karl Franzens-Universität Graz, Schubertstraße 51, A-8010 Graz (Austria).

## (164)

tree also reveals the lowest pigment contents and the highest contents of ascorbic acid. The sum of this symptoms indicate a photooxidative influence. Because of the uninfluenced wax structures an important influence of  $SO_2$  can be excluded. The physiological reactions of the needles of site 3 (1520 m a.s.l.) are characterized only by stress factors naturally occuring in these altitudes.

#### Zusammenfassung

BERMADINGER E., GRILL D. & GUTTENBERGER H. 1989. Thiole, Ascorbinsäure und Epikutikularwachse in Fichtennadeln aus dem Höhenprofil "Zillertal". – Phyton (Austria) 29 (3, Sonderband "Zillertal"): (163)–(185), 13 Abbildungen. – Deutsch mit englischer Zusammenfassung.

Im Rahmen des "Höhenprofiles Zillertal" wurden Nadeln von drei Bäumen (*Picea abies* [L.] Karst.) aus drei unterschiedlichen Höhenlagen untersucht (700 m, 1000 m, 1520 m Seehöhe). Bestimmt wurden die Gehalte der wasserlöslichen Thiole, die zur Hauptsache von Glutathion gebildet werden, die Gehalte an Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure, die Aktivität der Glutathionreduktase, die Gehalte der photosynthetischen Pigmente und die Struktur der Nadelwachse. Mit Ausnahme der Wachsstrukturen weisen alle untersuchten Substanzen einen ausgeprägten Jahresgang auf, wobei die Thiole und die Glutathionreduktase-Aktivität ein ausgeprägtes Maximum vor den Nadelaustrieb aufweisen, die Pigmente hingegen ein Minimum.

Dramatische Veränderungen und Abweichungen, die auf das extreme Einwirken natürlicher oder anthropogener Streßfaktoren zurückzuführen wären, sind an keinem der drei Bäume zu beobachten. Die Zusammenschau der erhobenen Daten erlaubt jedoch eine gewisse Differenzierung der drei Standorte aufgrund des Einwirkens verschiedener Luftschadstoffe. Die Nadeln des Baumes 1 (700 m Seehöhe) lassen deutliche Zerstörungen der Epikutikularwachse, einen geringen Ascorbinsäuregehalt und einen in der Oberkrone erhöhten Thiolgehalt erkennen. Dieser Merkmalskomplex deutet den Einfluß saurer Luftverunreinigungen, v. a. SO<sub>2</sub>, an. Baum 2 (1000 m Seehöhe) weist im April sehr geringe Enzymaktivitäten und einen hohen Xanthophyll/Carotin-Quotienten auf. Die Nadeln dieses Baumes enthalten auch die geringsten Pigment- und die höchsten Ascorbinsäuregehalte. Photooxidantien dürfte bei der Ausprägung dieses Merkmalskomplexes eine bedeutende Rolle zuzuschreiben sein. Aufgrund der unbeeinflußten Wachse kann ein deutlicher SO2-Einfluß an diesem Standort weitgehend ausgeschlossen werden. Die physiologischen Reaktionen der Nadeln des Baumes 3 (1520 m Seehöhe) sind von den in diesen Höhenlagen natürlich vorkommenden Streßfaktoren geprägt und weisen keine darüber hinausgehenden Beeinflussungen auf.

### Einleitung

Die Untersuchungen im Rahmen des "Höhenprofiles Zillertal" bezogen sich auf drei Bäume, die aufgrund der unterschiedlichen Höhenlage (700 m, 1000 m und 1520 m Seehöhe) verschiedenen Stressorenmustern ausgesetzt waren. Das Ziel der Arbeit war es, die durch natürliche und anthropogene Streßfaktoren bedingten Veränderungen zu erfassen (vgl. GLATTES & al. 1989).

(165)

Das Leben in einer sauerstoffreichen Atmosphäre ist selbst unter natürlichen Bedingungen für die Pflanzen stets mit einer gewissen Photooxidantienbelastung verbunden. Infolge von Stoffwechselreaktionen kommt es aber auch innerhalb der Pflanze ständig zur Bildung von toxischen Sauerstoffspezies (RENNENBERG 1988). Durch die laufende Produktion von Sauerstoff sowie durch die Existenz von angeregten Pigmentmolekülen und von reduzierten Redoxkomponenten herrschen im belichteten Photosyntheseapparat besonders geignete Bedingungen für die Entstehung von aktivierten, toxischen Sauerstoffspezies, wie Singulettsauerstoff, Superoxidanionen, Hydroxylradikalen und Wasserstoffperoxid, vor (ELST-NER 1982, WILD 1988). Diese reaktiven Sauerstoffverbindungen können die Chloroplasten und in weiterer Folge die gesamte Pflanze schädigen und müssen daher von der Zelle sorgfältig kontrolliert werden. Die Entgiftung von toxischen Sauerstoffspezies gehört somit zum alltäglichen Stoffwechselgeschehen in pflanzlichen Zellen (RENNENBERG 1988). Um eine kontinuierliche Funktion zu gewährleisten, haben Chloroplasten eine Vielzahl von Schutzmechanismen entwickelt (FOYER & HALLIWELL 1976, GOODWIN 1980, HALLIWELL 1984, RENNENBERG 1988, STROTHER 1988).

Zu diesem Schutzsystem gehören die Antioxidantien Ascorbinsäure, die rasch mit Superoxidanionen, mit Hydroxylradikalen und Singulettsauerstoff reagiert und Wasserstoffperoxid entgiftet (vgl. Abb. 1) und das reduzierte Glutathion, das rasch mit Hydroxylradikalen und Singulettsauerstoff reagiert, dem Schutz der Sulfhydrilgruppen von Enzymen dient und die Ascorbinsäure aus der Dehydroascorbinsäure regeneriert (vgl. Abb. 1) (HALLIWELL 1984). Auch die Carotinoide sind Teil dieses Schutzmechanismus, indem sie u. a. durch die Absorption von überschüssiger Anregungsenergie vom Chlorophyll die Bildung von Singulettsauerstoff verhindern können bzw. auch an der Entgiftung von Singulettsauerstoff beteiligt sind (GOODWIN 1980, HALLIWELL 1984). Die Ascorbinsäure und das Glutathion sind in einer Reaktionskette miteinander verbunden, wobei das oxidierte



Abb. 1: Entgiftungsschema für Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen in belichteten Chloroplasten; DAS – Dehydroascorbinsäure, AS – Ascorbinsäure, GSH – reduziertes Glutathion, GSSG – oxidiertes Glutathion, 1 – Glutathionreduktase (Aus HALLIWELL 1984, verändert)

Fig. 1: A detoxification-system of hydrogen peroxide and superoxide in illuminated chloroplasts; DAS – dehydroascorbic acid, AS – ascorbic acid, GSH – reduced glutathione, GSSG – oxidized glutathione, 1 – glutathione reductase (from HALLI-WELL 1984, modified)

(166)

Glutathion durch die Tätigkeit der Glutathionreduktase wieder in die reduzierte Form übergeführt wird (vgl. Abb. 1).

Die hohe Reaktivität von Photooxidantien, aber auch von SO<sub>2</sub>, kann ebenfalls zur Bildung von Radikalen führen bzw. die natürliche Radikalbildung verstärken (JÄGER & KLEIN 1980, RENNENBERG 1984, JÄGER & al. 1986). Übersteigt die Bildung toxischer Sauerstoffspezies diese Entgiftungskapazität, so kommt es zu Schädigungsreaktionen. In der Folge kann es u. a. zu Lipidperoxidationen, zu Pigmentoxidationen und damit zu einer Verminderung der photosynthetisch aktiven Pigmente und zu Störungen in den Redoxsystemen der Zelle kommen (HALLIWELL 1984, OSSWALD & ELST-NER 1986a). Veränderungen in den oben angeführten Entgiftungssystemen können auch als Indikatoren für eine Belastung mit Luftschadstoffen herangezogen werden (RENNENBERG 1984, KUNERT & EDERER 1985, JÄGER & al. 1986, MELHORN & al. 1986, OSSWALD & al. 1987, BERMADINGER & al. 1989).

Die hier dargestellten Untersuchungen im Rahmen des "Höhenprofiles Zillertal" befassen sich mit den annuellen Veränderungen im Gehalt von Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure und wasserlöslichen Sulfhydrilverbindungen, die zu 95–100% aus Glutathion bestehen (GRILL & ESTERBAUER 1973, ESTERBAUER & GRILL 1978, GRILL & al. 1988b), der damit in Zusammenhang stehenden Aktivität der Glutathionreduktase und den Photosynthesepigmenten. Zusätzlich wurde die Struktur der Epikutikularwachse untersucht, die den ersten Angriffspunkt für von außen an die Pflanze herantretende Stressoren darstellen. Diese Untersuchungen sollen einen Beitrag zur Frage nach der Möglichkeit eines ursachenspezifischen Nachweises von anthropogen bedingtem Streß leisten.

#### Material und Methode

Untersucht wurden Nadelproben von drei Fichten (*Picea abies* [L.] KARST.) aus unterschiedlicher Seehöhe (vgl. GLATTES & al. 1989): Baum 1 aus 700 m Seehöhe, Baum 2 aus 1000 m Seehöhe und Baum 3 aus 1520 m Seehöhe.

Die Ernte erfolgte 1988 in den Monaten Februar, April, Juni und August. Die Nadelproben wurden mit einer Stangenschere aus dem unteren Kronenbereich in der Nähe der für parallel laufende Untersuchungen ausgewählten Probeorte entnommen.

Für die Pigmentbestimmung mußten die Nadeln nach der Probenahme sofort konserviert werden: Jeweils 1 g des 1. bis 4. Nadeljahrganges wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Trockeneis ( $-60^{\circ}$ C) ins Labor nach Graz transportiert, wo die Proben bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-25^{\circ}$ C gelagert wurden. Die Zweige für die anderen Bestimmungen wurden bei lockerer Lagerung transportiert, wobei besonders darauf geachtet wurde, die Nadeln weder mechanisch noch thermisch zu belasten.

Für die Pigmentbestimmung wurden die Nadeln in einer Reibschale unter Zugabe von flüssigem Stickstoff und etwas Quarzsand zerrieben und mit Aceton ÖAB 9 extrahiert. Das Extrakt wurde rotavapiert und der Rückstand in 20 ml Aceton p. A. aufgenommen und zentrifugiert. 20 µl des zentrifugierten Extraktes wurden mittels einer HPLC-Gradienteneluation analysiert (PFEIFHOFER 1989). Säule: 5 µm Spherisorb ODS-2 (Forschungszentrum Seibersdorf); Laufmittel A (Acetonitril:aqua bidest.: Methanol = 100:10:5), Laufmittel B (Ethylacetat:Aceton = 2:1); linearer Gradient von 10% B bis 70% B in 17 min; Detektion bei 440 nm mit einem UV/VIS-Detektor (Angabe der Werte in  $\mu g g^{-1}$  Trockengewicht).

Zur Bestimmung der Glutathionreduktase-Aktivität wurde jeweils von 1 g frischer Nadeln Acetontrockenpulver bereitet und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-25^{\circ}$ C gelagert. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte photometrisch durch die Verfolgung der Abnahme der NADPH-Absorption bei 340 nm (ESTERBAUER & GRILL 1978) (Angabe der Werte in Units g<sup>-1</sup> Frischgewicht).

Für die Bestimmung der wasserlöslichen Thiole und der Ascorbinsäure wurden im Labor jeweils 1 g frischer Nadeln mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei  $-25^{\circ}$ C gelagert.

Die Summe der wasserlöslichen Thiole wurde photometrisch durch Umsatz mit DTNB (Ellmann-Reagenz) bei 412 nm gemessen (GRILL & ESTERBAUER 1973, GRILL & al. 1982) (Angabe der Werte in  $\mu$ mol g<sup>-1</sup> Frischgewicht).

Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure wurden mit Zitronensäure aus dem Nadelhomogenat extrahiert. Die Analyse erfolgte mittels einer isokratischen HPLC-Methode, modifiziert nach BUI-NGUYEN 1980 und WIMANLASIRI & WILLS 1983. Säule: Sperisorb S 5-NH<sub>2</sub> (Forschungszentrum Seibersdorf); Laufmittel (Methanol:0,03 mol NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 3:1), Detektion mittels UV/VIS-Detektor bei 268 nm. Die in den Extrakten enthaltene Dehydroascorbinsäure wurde durch die Zugabe eines Überschusses an Natriumborhydrid zu Ascorbinsäure reduziert und wie oben angeführt bestimmt (Angabe der Werte in mg g<sup>-1</sup> Frischgewicht).

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden nach GRILL 1973 an bei Zimmertemperatur luftgetrockneten Nadeln durchgeführt. Nach dem Besputtern mit Gold wurden die Proben in einem Cambridge Stereoscan Mark II-a bei 30 kV Anodenspannung untersucht.

#### Ergebnisse

a) Gehalt an wasserlöslichen Thiolen (Abb. 2)

Der Thiolgehalt läßt bei den drei Probebäumen 1, 2 und 3 einen ähnlichen saisonalen Verlauf erkennen (Abb. 2). Bei allen Nadeljahrgängen ist ein mehr oder weniger deutliches Frühjahrs- (April) bzw. Frühsommermaximum das Thiolgehaltes zu beobachten. Danach nehmen die Gehalte bis zum Sommer wieder sehr deutlich ab (Abb. 2).

Der Thiolgehalt der Nadeln des Jahrganges 87 nimmt beim Baum 1 von Februar bis August kontinuierlich ab, während er bei den Nadeln des Baumes 2 im April ein deutliches Maximum des Gehaltes erreicht (0,419 µmol g<sup>-1</sup> Frischgewicht). Bei den gleichaltrigen Nadeln des Baumes 3 ist ein Maximum des Thiolgehaltes im Juni zu beobachten (0,537 µmol g<sup>-1</sup>) (vgl. Abb. 2). Die Nadeln des Jahrganges 86 lassen sowohl beim Baum 1 als auch bei Baum 2 ein Ansteigen des Thiolgehaltes von Februar bis April erkennen, bis Juni sinken die Werte danach wieder deutlich ab. Beim Baum 3 weist der Thiolgehalt des Jahrganges 86 von Februar bis Juni ein deutliches Ansteigen auf. Die Gehalte der jungen Nadeln (Jg. 88) nehmen von Juni bis August sehr deutlich ab (Abb. 2).

## (168)

Im August sind beim Nadeljahrgang 87 keine deutlichen Unterschiede im Thiolgehalt der einzelnen Standorte zu erkennen. Beim Nadeljahrgang 88 weist Baum 3 die höchsten Gehalte auf (0,243  $\mu$ mol g<sup>-1</sup>) gefolgt von Baum 1 (0,213  $\mu$ mol g<sup>-1</sup>) und Baum 2 (0,206  $\mu$ mol g<sup>-1</sup>) (Abb. 2).

Im August wurden zusätzlich bei den Bäumen 1 und 2 auch Proben aus der Oberkrone entnommen. Die jungen Nadeln (Jg. 88) der Unterkrone von Baum 1 enthielten nur 68%, die des Jg. 87 82% des Thiolgehaltes der Nadeln der Oberkrone. Bei den Nadeln des Baumes 2 waren keine Unterschiede im Thiolgehalt von Ober- und Unterkrone erkennbar.

#### b) Glutathionreduktase-Aktivität (Abb. 3)

Die Aktivität der Glutathionreduktase ist bei allen untersuchten Nadelproben kleiner als 1 Unit  $g^{-1}$  Frischgewicht und läßt ein Frühjahrsbzw. Frühsommermaximum erkennen. So weisen die Nadeln des Jahrganges 86 bei den Bäumen 1 und 3 ein Maximum der Enzymaktivität im April auf (0,60 Units  $g^{-1}$  bzw. 0,86 Units  $g^{-1}$ ), während die gleichalten Nadeln des Baumes 2 zu diesem Termin ein sehr ausgeprägtes Minimum der Enzymaktivität erkennen lassen (0,35 Units  $g^{-1}$ ).

Bei den einjährigen Nadeln (Jg. 87) des Standortes 3 sind im August die höchsten Enzymaktivitäten zu finden (0,23 Units  $g^{-1}$ ), während sich die Nadeln von Baum 1 und Baum 2 kaum unterscheiden (0,14 bzw. 0,15 Units  $g^{-1}$ ). Die jungen Nadeln (Jg. 88) von Baum 1 und Baum 2 weisen nur 63%, der Nadeljahrgang 87 81% der Enzymaktivität der gleichalten Nadeln von Baum 3 auf (Abb. 3).

Bei den Nadeln der Bäume 1 und 3 verlaufen Thiolgehalt und Glutathionreduktase-Aktivität annähernd parallel (vgl. Abb. 2 und 3). Bei den einjährigen Nadeln (Jg. 87) des Baumes 2 ist das Maximum der Enzymaktivität erst zwei Monate später (Juni) als jenes des Thiolgehaltes (April) zu finden. Bei den zweijährigen Nadeln (Jg. 86) von Baum 2 ist im April ein Maximum des Thiolgehaltes und gleichzeitig ein Minimum der Glutathionreduktase-Aktivität zu beobachten (vgl. Abb. 2 und 3).

## c) Gehalt an Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure (Abb. 4, Tab. 1).

Der Ascorbinsäuregehalt nimmt bei allen untersuchten Nadelproben von Februar bis April ab. Danach erfolgt mit Ausnahme des Jg. 86 von Baum 2 ein neuerlicher Anstieg des Ascorbinsäuregehaltes bis Juni. Bei den einjährigen Nadeln (Jg. 87) von Baum 1 und 3 ist in der Folge bis August eine deutliche Abnahme des Ascorbinsäuregehaltes zu beobachten, während er bei den gleich alten Nadeln des Baumes 2 bis August weiter zunimmt (Abb. 4). Bei den Nadeln des Baumes 1 ist der Verlauf des Ascorbinsäuregehaltes der ein- (Jg. 87) und zweijährigen (Jg. 86) Nadeln von Februar bis Juni nahezu ident, die Differenz zwischen den ein- und zweijährigen Nadeln beträgt im Juni nur 0,35 mg Ascorbinsäure g<sup>-1</sup> Frischge-

(169)

wicht. Bei den Bäumen 2 und 3 entwickeln sich die beiden Kurven deutlich auseinander. So beträgt die Differenz zwischen den Jahrgängen 87 und 86 beim Baum 2 im Juni 0,47 mg und beim Baum 3 sogar 1,28 mg Ascorbinsäure g<sup>-1</sup>. In den jungen Nadeln (Jg. 88) von Baum 1 nimmt der Ascorbinsäuregehalt geringfügig ab, während er in den jungen Nadeln des Baumes 2 leicht (von 0,89 mg g<sup>-1</sup> bis 1,15 mg g<sup>-1</sup>) und in jenen des Baumes 3 sehr stark zunimmt (von 0,06 mg g<sup>-1</sup> bis 1,10 mg g<sup>-1</sup>) (Abb. 4).

Im August sind bei den jüngsten Nadeln (Jg. 88) keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Standorten zu beobachten. Beim Nadeljahrgang 87 ist der Gehalt beim Standort 2 mit 2,75 mg g<sup>-1</sup> am höchsten, gefolgt vom Standort 3 (2,16 mg g<sup>-1</sup>) und Standort 1 (1,83 mg g<sup>-1</sup>).

Im Februar konnte in allen untersuchten Nadeln Dehvdroascorbinsäure nachgewiesen werden (Tab. 1). Mit Ausnahme des Jahrganges 87 des Baumes 2 und der jungen Nadeln (Jg. 88) von Baum 3 sind zu diesem Termin die höhsten Dehydroascorbinsäuregehalte (sowohl absolut als auch in Prozent des Ascorbinsäuregehaltes) zu beobachten. Im Vergleich zum Ascorbinsäuregehalt enthielten im Februar die einjährigen Nadeln (Jg. 87) von Baum 1 25%, von Baum 2 20% und von Baum 3 17% Dehvdroascorbinsäure. Bei den zweijährigen Nadeln (Jg. 86) lauten die entsprechenden Werte 14% für Baum 1, 3% für Baum 2 und 12% für Baum 3. Im April wurde nur bei den Nadeln des Baumes 2 Dehydroascorbinsäure festgestellt (9% des Ascorbinsäuregehaltes für den Jg. 87, 7% für Jg. 86). Im Juni war in den Nadeln von Baum 1 keine Dehydroascorbinsäure nachweisbar; beim Nadeljahrgang 87 von Baum 2 betrug der Gehalt 15%, bei den gleichalten Nadeln von Baum 3 7% des Ascorbinsäuregehaltes. Die jungen, gerade im Austrieb befindlichen Nadeln des Baumes 3 enthielten 33% Dehydroascorbinsäure. Beim Augusttermin weisen die jungen Nadeln (Jg. 88) von Baum 1 nur 3%, jene von Baum

Sample	Needle year	February	April	June	August
1	88	_	-	0	0.04
	87	0.72	0	0	0.26
	86	0.40	0	0	-
2	88	—	—	0	0.11
	87	0.56	0.19	0.38	0.01
	86	0.10	0.21	0	-
3	88	-	_	0.02	0.42
	87	0.42	0	0.23	0
	86	0.43	0	0	-

Tabelle 1 / Table 1 Gehalte an Dehydroascorbinsäure (mg g<sup>-1</sup> Frischgewicht); (- = nicht bestimmt).

Contents of dehydroascorbic acid (mg  $g^{-1}$  fresh weight); (- = non determined).

## (170)

2 10% und jene des Baumes 3 38% Dehydroascorbinsäure im Vergleich zum Ascorbinsäuregehalt auf (Tab. 1).

## d) Pigmente

Die angewandte Methode der Pigmentanalyse erlaubt die Trennung des Extraktes in 10 Plastidenpigmente. Um die Übersichtlichkeit zu gewährleisten, sollen die einzelnen Pigmente jedoch in funktionell zusammengehörigen Gruppen besprochen werden: Chlorophylle (Chlorophyll a, Chlorophyll b), Carotine ( $\alpha$ -,  $\beta$ -Carotin), Xanthophylle (Neoxanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin, Zeaxanthin, Lutein). Zusätzlich soll auf die Komponenten des Xanthophyllzyklusses (Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin) kurz eingegangen werden. In allen untersuchten Proben war der Phäophytingehalt nie höher als jene Menge, die bei der Extraktion der Plastidenpig-

Abb. 3: Aktivität der Glutathionreduktase im Zeitraum Februar bis August 1988 (Units g<sup>-1</sup> Frischgewicht); Bezeichnungen wie in Abb. 2

- Fig. 3: Glutathione-reduct ase activity (Units  ${\rm g}^{-1}$  fresh weight); symbols are the same as in fig. 2
- Abb. 4: Ascorbinsäuregehalt im Zeitraum Februar bis August 1988 (mg g $^{-1}$  Frischgewicht); Bezeichnungen wie in Abb. 2
- Fig. 4: Contents of ascorbic acid in the peroid february to august 1988 (mg  $g^{-1}$  fresh weight); the symbols are the same as in fig. 2

Abb. 5: Gesamtchlorophyllgehalt (Summe von Chlorophyll a und Chlorophyll b) im Zeitraum Februar bis August 1988 (mg g<sup>-1</sup> Trockengewicht); Bezeichnungen wie in Abb. 2

Fig. 5: Total chlorophyll content (Sum of chlorophyll a and b) in the period february to august 1988 (mg  $g^{-1}$  dry weight); the symbols are the same as in fig. 2

Abb. 6: Geamtxanthophyllgehalt (Summe von Neoxanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin, Lutein und Zeaxanthin) ( $\mu g g^{-1}$  Trockengewicht); Bezeichnungen wie in Abb. 2

- Fig. 6: Total xanthophyll content (sum of neoxanthin, antheraxanthin, violaxanthin, lutein and zeaxanthin) ( $\mu$ g g<sup>-1</sup> dry weight); the symbols are the same as in fig. 2
- Abb. 7: Gesamtcarotingehalt (Summe von  $\alpha$  und  $\beta$ -Carotin) ( $\mu$ g g<sup>-1</sup> Trockengewicht); Bezeichnungen wie in Abb. 2
- Fig. 7: Total carotin content (sum of  $\alpha-$  and  $\beta-carotin)$  (µg g^{-1} dry weight); the symbols are the same as in fig. 2

Abb. 2: Gehalt an wasserlöslichen Thiolen der drei Bäume im Zeitraum Februar bis August 1988 (µmol g<sup>-1</sup> Frischgewicht); 2 – Februar, 4 April, 6 – Juni, 8 – August Fig. 2: Contents of watersoluble thiols of the three investigated trees in the period february to august 1988 (µmol g<sup>-1</sup> fresh weight); 2 – february, 4 – april, 6 – june, 8 – august



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

(172)

mente trotz des Einhaltens von Vorsichtsmaßnahmen immer wieder gebildet wird.

Alle Pigmentklassen lassen einen ausgeprägten Jahresgang erkennen (Abb. 5-7).

Bei den Nadeln des Baumes 1 ist, mit Ausnahme des Jahrganges 86, ein kontinuierlicher Anstieg des Chlorophyllgehaltes von Februar bis August zu beobachten (Abb. 5). Die Zunahme des Chlorophyllgehaltes bis August im Vergleich zum Februar beträgt durchschnittlich 158%. Bei allen Probeterminen weisen die Nadeln des Jahrganges 86 die jeweils höchsten Chlorophyllgehalte auf. Hingegen lassen sowohl die Nadeln des Baumes 2 als auch jene des Baumes 3 ein ausgeprägtes Minimum des Chlorophyllgehaltes im April (Jg. 87 und 86 von Baum 2, Jg. 85 von Baum 3) bzw. im Juni (Jg. 85 von Baum 2, Jg. 87 und 86 von Bau 3) erkennen (Abb. 5). Aber auch hier sind die höchsten Chlorophyllgehalte im August zu finden. So beträgt die Zunahme im Vergleich zum Februar (100%) bei den Nadeln des Baumes 2 durchschnittlich 132%, bei jenen des Baumes 3 sogar 162%. Die jungen Nadeln (Jg. 88) der Bäume 1 und 3 weisen von Juni bis August eine deutliche Zunahme des Chlorophyllgehaltes auf, während der Gehalt in den jungen Nadeln des Baumes 2 von Juni bis August um ca. 10% abnimmt (Abb. 5).

Mit Ausnahme der Nadeln des Baumes 1 enstprechen die saisonalen Veränderungen des Xanthophyllgehaltes ungefähr jenen der Chlorophylle (Abb. 6). Bei den Nadeln aller drei untersuchten Bäume nimmt der Xanthophyllgehalt von Februar bis April (Jg. 86 von Baum 1, Jg. 87 und 86 von Baum 2, Jg. 85 von Baum 3) bzw. Juni (Jg. 87 und 85 von Baum 1, Jg. 85 von Baum 2, Jg. 87 und 86 von Baum 3) ab, danach erfolgt ein Anstieg des Xanthophyllgehaltes bis August. Bei den Nadeln der Bäume 2 und 3 sind die Minima stärker ausgeprägt als bei jenen des Baumes 1 (Abb. 6). Wie bereits beim Chlorophyll zu beobachten war, weisen die vierjährigen Nadeln des Baumes 2 (Jg. 85) im Juni einen äußerst geringen Xanthophyllgehalt auf (170  $\mu$ g g<sup>-1</sup>, im Vergleich dazu 488  $\mu$ g g<sup>-1</sup> bei den gleichalten Nadeln von Baum 1 und 443  $\mu$ g g<sup>-1</sup> bei Baum 3) (Abb. 6). Mit Ausnahme des Nadeljahrganges 86 von Baum 2 sind die Xanthophyllgehalte jeweils im August am höchsten. Im Vergleich zum Februar (100%) beträgt die Zunahme bis August bei den Nadeln des Baumes 1 durchschnittlich 120%, bei jenen des Baumes 2 nur 104% und bei jenen des Baumes 3 122%.

Die saisonalen Veränderungen des Carotingehaltes sind großteils durch ein Frühjahrsmaximum (April) und ein Frühsommerminimum (Juni) gekennzeichnet (Abb. 7). Bei den Nadeln der Bäume 2 und 3 ist dieser Verlauf stärker ausgeprägt als bei jenen des Baumes 1. Wie bereits beim Chlorophyll- und beim Xanthophyllgehalt weisen die vierjährigen Nadeln (Jg. 85) des Baumes 2 im Juni einen extrem geringen Carotingehalt auf. Bei allen Proben, mit Ausnahme des Nadeljahrganges 87 des Baumes 2, ist der Verlauf des Carotingehaltes von Februar bis April gegenläufig zu jenem des Xanthophyllgehaltes (Abb. 7): Der Carotingehalt nimmt von Februar bis

(173)



Abb. 8 (links): Quotient Xanthophyll- zu Carotingehalt; Bezeichnungen wie in Abb. 2 Fig. 8 (on the left): Quotient xanthophyll to carotin content; the symbols are the same as in fig. 2

Abb. 9 (rechts): Quotient  $\alpha$ - zu  $\beta$ -Carotin; Bezeichnungen wie in Abb. 2 Fig. 9 (on the right): Quotient  $\alpha$ - to  $\beta$ -carotin; the symbols are the same as in fig. 2

April zu, während er beim Jg. 87 des Baumes 2 von Februar bis April deutlich abnimmt. Auch bei dieser Pigmentgruppe sind die höchsten Gehalte jeweils im August zu finden. Im Vergleich zum Februar beträgt die Carotinzunahme bis August bei den Nadeln des Baumes 1 durchschnittlich 131%, bei den Nadeln des Baumes 2 110% und bei jenen des Baumes 3 133% (Abb. 7).

Der saisonale Verlauf des Quotienten Xanthophyll zu Carotin weist ein ausgeprägtes Minimum im April (Jg. 87 und 85 von Baum 1, Jg. 85 und 86 von Baum 2, Jg. 85 von Baum 3) bzw. im Juni (Jg. 86 von Baum 1, Jg. 87 von Baum 2, Jg. 87 und 86 von Baum 3) auf (Abb. 8). Im Gegensatz zu den drei Pigmentgruppen sind die höchsten Quotienten jeweils im Februar zu finden. Der Jg. 87 des Baumes 2 weist im April ein Maximum des Xanthophyll/ Carotin-Quotienten auf, während dieser Quotient bei allen anderen Proben von Februar bis April deutlich abnimmt (Abb. 8).

Der Quotient  $\alpha$ -Carotin zu  $\beta$ -Carotin nimmt von Februar bis August kontinuierlich zu (Abb. 9). Die Nadeljahrgänge eines Baumes unterscheiden sich nur sehr geringfügig voneinander, die einzelnen Kurven verlaufen nahezu ident. Im Vergleich zum Wert des Februartermines (100%) beträgt diese Zunahme bis August bei den Nadeln des Baumes 1 im Durchschnitt 384%, bei den Nadeln des Baum 2 307% und bei jenen des Baumes 3 durchschnittlich nur 242%.

## (174)

Die Gehalte der Pigmente des Xanthophyllzyklusses, Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin, sind in Tabelle 2 angeführt. Zeaxanthin war nur im Februar und bei den Nadeln des Baumes 1 auch noch im April nachweisbar (Tab. 2). Antheraxanthin war im Februar und in den Nadeln

#### Tabelle 2 / Table 2

Pigmente des Xanthophyllzyklus (μg g<sup>-1</sup> Trockengewicht);
– = nicht bestimmt; 2 = Februar, 4 = April, 6 = Juni, 8 = August. Pigments of the xanthophyll cycle (μg g<sup>-1</sup> dry weight);
– = non determined; 2 = February, 4 = April, 6 = June, 8 = August.

Sample	Needle	Viol	Violaxanthin			Antheraxanthin			
	year	2	4	6	8	2	4	6	8
1	88	-	-	97	51	_	_	3	6
	87	24	18	94	88	29	18	2	13
	86	39	43	130	120	46	32	3	13
	85	35	34	139	129	47	31	3	15
2	88	-		78	24	-	_	4	8
	87	33	77	122	89	41	6	5	18
	86	43	80	115	95	61	4	4	20
	85	28	74	42	107	47	4	2	19
3	88	-	-	22	39	—	-	4	27
	87	11	90	50	93	26	2	3	24
	86	26	94	93	110	40	2	6	25
	85	29	81	121	92	42	3	4	26

Tabelle 2: Fortsetzung / Table 2: continued

Sample	Needle	Zear	Zeaxanthin			Sum			
	year	2	4	6	8	2	4	6	8
1	88	-	_	0	0	_	_	100	57
	87	61	56	0	0	114	92	96	101
	86	54	42	0	0	139	117	133	133
	85	47	33	0	0	129	98	142	144
2	88	-	-	0	0	-	-	82	32
	87	43	0	0	0	117	83	127	107
	86	75	0	0	0	179	84	119	115
	85	77	0	0	0	152	78	44	126
3	88		-	0	0	_	-	26	66
	87	74	0	0	0	111	92	53	117
	86	83	0	0	0	149	96	99	135
	85	73	0	0	0	144	84	125	118

(175)

des Baumes 1 auch noch im April nennenswerter Weise zu finden. Der Violaxanthingehalt nimmt bis Juni sehr deutlich zu, wobei der Anstieg erst dann deutlich wird, wenn der Gehalt an Zeaxanthin und Antheraxanthin zurückgeht (Tab. 2). Die Anwesenheit von Zeaxanthin war abhängig von den Lichtverhältnissen, die unmittelbar vor der Probenahme am jeweiligen Standort zu finden waren. Im Februar erfolgte die Probenahme im Laufe des späteren Vormittags bei Schönwetter. Im April wurden die Nadeln von Baum 1 zu Mittag nach sehr hohen Einstrahlungswerten am Vormittag gesammelt, jene von Baum 2 während eines Gewitters und jene von Baum 3 am Abend. Im Juni und im August erfolgte die Probenahme stets am frühen Vormittag bei bewölktem Himmel. D. h. nur bei guten Lichtverhältnissen vor der Probeentnahme war Zeaxanthin in den Nadeln nachzuweisen. Die Summe der drei Pigmente weist dieselben annuellen Veränderungen auf wie sie auch beim Gesamtxanthophyllgehalt zu beobachten sind (Tab. 2, Abb. 6).

Die Daten des Augusttermines sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Bei den Nadeln des Baumes 2 steigt der Chlorophyllgehalt vom 1. bis zum 4. Nadeljahrgang kontinuierlich an, während er bei den Nadeln von Baum 1 und Baum 3 nach dem 3. Jg. eine leichte Abnahme erkennen läßt. Der Carotingehalt weist bei allen drei Bäumen einen maximalen Gehalt bei den dreijährigen Nadeln (Jg. 86) auf. Bei den Xanthophyllen steigt der Gehalt bei den Nadeln der Bäume 1 und 2 kontinuierlich bis zum 4. Jg. an. während er bei den Nadeln des Baumes 3 bei den dreijährigen Nadeln ein Maximum erkennen läßt. Die höchsten Pigmentgehalte sind bei allen Nadeljahrgängen des Baumes 1, die geringsten jeweils bei den Nadeln des Baumes 2 zu finden. Die jungen Nadeln (Jg. 88) von Baum 2 erreichen nur 58% des Chlorophyllgehaltes, 60% des Xanthophyllgehalts und 59% des Carotingehaltes der jungen Nadeln des Baumes 1. Bei den jungen Nadeln von Baum 3 ist diese Verminderung nur beim Carotingehalt mit 55% ähnlich stark ausgeprägt, der Chlorophyllgehalt erreicht 76%, der Xanthophyllgehalt 87% des Wertes der jungen Nadeln von Baum 1. Bei den anderen Jahrgängen ist die Verminderung nicht so deutlich und beträgt im Durchschnitt bei den Nadeln von Baum 2 83% beim Chlorophyll, 85% für das Xanthophyll und 79% für das Carotin. Die entsprechenden Werte für die Nadeln von Baum 3 sind 91% bei Chlorophyll und Xanthophyll und 84% beim Carotingehalt. Die jungen Nadeln (Jg. 88) des Baumes 3 weisen einen sehr hohen Xanthophyll/Carotin-Quotienten auf (2,29 gegenüber 1,45 bei Baum 1 und 1,48 bei Baum 2), während bei den anderen Jahrgängen kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Standorten festzustellen ist. Auch die Quotienten Chlorophyll a zu Chlorophyll b und Chlorophyll zu Carotinoiden (Summe von Carotinen und Xanthophyllen) weisen keine Unterschiede zwischen den drei Bäumen auf. Deutliche Unterschiede lassen sich aber beim Quotienten  $\alpha$ -Carotin zu  $\beta$ -Carotin erkennen. Die Nadeln des Baumes 1 weisen stets die höchsten  $\alpha/\beta$ -Quotienten auf. Die Nadeln des Baumes 2 erreichen im Durchschnitt nur

## Tabelle 3 / Table 3

Sample	Needle year	Chlorophyll	Xanthophyll	Carotin
1	88	3399	463	319
	87	3842	517	324
	86	4711	639	362
	85	4445	647	306
2	88	1971	279	188
	87	3288	467	269
	86	3712	524	261
	85	3761	539	250
3	88	2593	404	177
	87	3608	497	271
	86	4455	613	314
	85	3704	531	245

## Pigmentgehalte ( $\mu g g^{-1}$ Trockengewicht), Termin August 1988. Pigment content ( $\mu g g^{-1}$ dry weight), August 1988.

Tabelle 3: Fortsetzung / Table 3: continued

Sample	Needle year	Xanthophyll/ Carotin	Chlorophyll a/b	$\alpha - /\beta -$ Carotin	Chlorophyll/ Carotinoids
1	88	1.45	3.10	2.19	4.35
	87	1.60	3.57	2.12	4.57
	86	1.76	3.60	1.98	4.71
	85	2.12	3.46	1.88	4.67
2	88	1.48	3.09	1.47	4.22
	87	1.74	3.77	1.49	4.47
	86	2.01	3.65	1.39	4.73
	85	2.16	3.60	1.38	4.77
3	88	2.29	3.61	1.17	4.46
	87	1.84	3.78	1.25	4.70
	86	1.95	3.48	1.36	4.81
	85	2.17	3.40	1.25	4.77

70% des Wertes der Nadeln von Baum 1, jene des Baumes 3 im Durchschnitt nur 62% (Tab. 3).

e) Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Nadel<br/>oberflächen (Abb. 10-13).

Bewertet wurde das Wachs in der Umgebung und in den Vorhöfen der eingesenkten Spaltöffnungen.

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



Abb. 10-13: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen Fig. 10-13: Scanning-electron-microscopic investigations

Abb. 10: Standort 1, Jg. 88; unbeeinflußtes Wachs auf der Oberfläche und im Spaltöffnungsvorhof; Balken = 8,4 μm

Fig. 10: Site 1, needle year 88; uninfluenced wax structures in the stomatal antechamber and on the sourrounding surface; bar =  $8.4 \ \mu m$ 

Abb. 11: Standort 1, Jg. 87; deutliche Staubauflagerungen, die Wachsröhrchen weisen deutliche Verklebungen auf; Balken = 8,4 μm

Fig. 11: Site 1, needle year 87; heavy dust load on the surface, the wax rods in the antechamber begin to melt; bar =  $8.4 \,\mu m$ 

Abb. 12: Standort 1, Jg. 86 weitgehende Wachsverklebungen, die kristalline Struktur ist zerstört; Balken = 1,68 μm

Fig. 12: Site 1, needle year 86; heavily influenced antechamber wax, the crystalline structure of the wax rods is lost; bar = 1.68  $\mu m$ 

Abb. 13: Standort 2, Jg. 87; unbeeinflußte Wachsstrukturen im Spaltöffnungsbereich; Balken =  $4,2 \mu m$ 

Fig. 13: Site 2, needle year 87; uninfluenced antechamber wax; bar =  $4.2 \ \mu m$ 

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at (178)

Die Nadeln des Baumes 1 weisen eine relativ hohe Staubbelastung auf. Die jungen Nadeln (Jg. 88) lassen im Spaltöffnungsvorhof schöne, nahezu unbeeinflußte Wachsstrukturen erkennen (Abb. 10). Bereits beim Nadeljahrgang 87 sind deutlichere und weitgehendere Zerstörungen der Epikutikularwachse zu beobachten: die Wachsröhrchen im Spaltöffnungsvorhof beginnen zu verkleben, die Oberfläche erodiert (Abb. 11). Beim Nadeljahrgang 86 ist dieser Prozeß noch weiter fortgeschritten, die kristallinen Strukturen sind weitgehend zerstört, die Spaltöffnungen von einer amorphen Wachsmasse überzogen (Abb. 12).

Die Nadeln der Standorte 2 und 3 ähneln einander in der Ausbildung der Epikutikularwachse und weichen in ihrem Erscheinungsbild deutlich von jenem des Standortes 1 ab. Die Wachsstrukturen von 2 und 3 sind durchwegs schön ausgebildet und zeigen auch auf den älteren Nadeln keine Anzeichen einer verstärkten Wachsbeeinflussung (Abb. 13).

#### Diskussion

Mit Ausnahme der Nadeln des Baumes 2 (1000 m Seehöhe) entsprechen die beobachteten saisonalen Veränderungen im Gehalt an wasserlöslichen Thiolen, die zu 95–100% aus Glutathion bestehen (GRILL & ESTERBAUER 1973, ESTERBAUER & GRILL 1978, GRILL & al. 1982), und der Glutathionreduktase-Aktivität dem bereits aus früheren Untersuchungen bekannten Verlauf (GRILL & ESTERBAUER 1973, ESTERBAUER & GRILL 1978, GRILL & al. 1988b). Das bekannte Maximum des Thiolgehaltes und der Enzymaktivität im Spätwinter (Jänner, Februar) war im Februar bei den Proben aus dem Zillertal nicht zu beobachten. Die Ursache dafür dürfte darin zu suchen sein, daß der Winter 1987/88 (Dezember–Februar) in ganz Österreich um ca.  $2^{\circ}-3^{\circ}$ C wärmer war als der langjährige Durchschnitt (KAISER, schriftliche Mitteilung). Das schon von GRILL & ESTERBAUER 1973, ESTERBAUER & GRILL 1978 und GRILL & al. 1982 beschriebene Maximum des Thiolgehaltes und der Aktivität der Glutathionreduktase vor dem Austrieb war bei allen Proben vorhanden.

Die saisonalen Veränderungen des Ascorbinsäuregehaltes entsprechen ebenfalls im prinzipiellen Verlauf bereits durchgeführten Untersuchungen (ESTERBAUER & al. 1980). Dasselbe gilt für die Pigmente, die ein ausgeprägtes Frühjahrsminimum erkennen lassen (GRILL & al. 1983, GRILL & PFEIFHO-FER 1985).

Die drei Bäume zeigen einen deutlich gestaffelten Austrieb. Während die jungen Nadeln von Baum 1 (700 m Seehöhe) und Baum 2 (1000 m Seehöhe) im Juni bereits relativ weit entwickelt sind, beginnt Baum 3 (1520 m Seehöhe) im Juni erst mit dem Austrieb. Die Unterschiede, die im Zeitraum Juni bis August bei den jungen Nadeln der drei Standorte zu beobachten sind, sind auf diesen zeitlich versetzten Austrieb zurückzuführen. Die jungen Nadeln des Baumes 3 sind auch im August noch nicht

(179)

ausgereift (geringe Trockensubstanzproduktion) und weisen einen sehr hohen Xanthophyll/Carotin-Quotienten auf, was als Anzeichen für Vergilbung genommen werden kann (PFEIFHOFER & GRILL 1987).

Die vor dem Austrieb zu beobachtenden Maxima (Thiolgehalt, Glutathionreduktase-Aktivität) bzw. Minima (Pigmente) zeigen entsprechend dem gestaffelten Austrieb eine zeitliche Verschiebung. So ist das typische Maximum des Thiolgehaltes und der Glutathionreduktase-Aktivität vor dem Austrieb bei Baum 1 nur angedeutet. Bei den Nadeln des Baumes 2 ist es im April zu erkennen, bei jenen des Baumes 3 erst im Juni. Bei den Nadeln von Baum 3 ist das typische Pigmentminimum mehr oder weniger deutlich ebenfalls um ca. zwei Monate später ausgebildet als bei den anderen zwei Bäumen.

Die saisonalen Veränderungen im Thiolgehalt und in der Aktivität der Glutathionreduktase ähneln einander im zeitlichen Verlauf bei Baum 1 und 2. Das läßt den Schluß zu, daß sich diese zwei Bäume entwicklungsphysiologisch in vergleichbaren Stadien befinden, während Baum 3 ca. zwei Monate nachhinkt. Diese entwicklungsphysiologisch bedingten zeitlichen Verschiebungen lassen sich mit den Monatsmitteltemperaturen der einzelnen Standorte korrelieren. So ist Standort 2 im Durchschnitt nur um 1,03°C kühler als Standort 1, während Standort 3 durchschnittlich um 4,85°C kühler ist als Standort 1 und 3,82°C kühler als Standort 2 (GLATTES 1989).

Die hier dargestellten Untersuchungen waren darauf ausgerichtet, die durch natürliche und anthropogene Streßfaktoren bedingten Veränderungen des Streßniveaus zu erfassen (GLATTES & al. 1989) und sollten klären, ob es möglich ist, anthropogen bedingten Streß ursachenspezifisch nachzuweisen.

Übersteigt der Eintrag von Schadstoffen (z. B. Photooxidantien) die Entgiftungskapazität der betroffenen Zellen, kommt es zu primären Schädigungsreaktionen. Daraus resultiert eine Veränderung des Stoffwechsels, der durch Reparatur- und Kompensationsmechanismen entgegengewirkt werden kann. Übersteigt der Schadstoffeintrag auch diese Möglichkeit, kommt es zu einer Schädigung (RENNENBERG 1988). Die Beurteilung der Streßsituation, der die drei Probebäume ausgesetzt sind, kann nur aufgrund der Gesamtheit der gewonnenen physiologischen und strukturellen Daten erfolgen.

Dem Xanthophyllzyklus wird eine Schutzfunktion gegenüber Photooxidation zugeschrieben (DEMMIG & al. 1987). Er ist in der Lage, Membraneigenschaften zu beeinflussen und stellt somit ein regulatorisches System für die Photosynthese dar (SIEFERMANN-HARMS 1977). Die hier durchgeführten Untersuchungen haben deutlich gezeigt, daß eine Bearbeitung der Dynamik des Xanthophyllzyklusses unbedingt eine Standardisierung der Probenahme, v. a. der Belichtungsverhältnisse vor der Probenahme erfordert (vgl. SIEFERMANN-HARMS 1977). Unter "Freilandbedingungen" sind diese geforderten Bedingungen allerdings nicht zu erfüllen, weshalb auch ©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at (180)

eine Aussage über die Funktionsfähigkeit des Xanthophyllzyklusses nicht zulässig ist.

Bäume, die in größerer Seehöhe wachsen, sind einer Vielzahl von Streßfaktoren ausgesetzt (durch die Seehöhe bedingte Klimafaktoren, Strahlung, eine gewisse natürliche Photooxidantienbelastung) und brauchen spezifische physiologische Anpassungsmechanismen, um mit diesen Belastungen fertig zu werden (GRILL & al. 1988b). Die Nadeln des höchstgelegenen Baumes 3 (1520 m Seehöhe) weisen die höchsten Thiolgehalte und die höchsten Glutathionreduktase-Aktivitäten auf, was als deutlicher Hinweis dafür gewertet werden kann, daß Baum 3 dem größten klimatischen Streß (bedingt durch die Seehöhe) ausgesetzt ist (ESTERBAUER & GRILL 1978, LEVITT 1980, GRILL & al. 1988b). Der Quotient  $\alpha$ -/ $\beta$ -Carotin ist bei den Nadeln des Baumes 3 gegenüber jenen der anderen zwei Probebäume deutlich verringert, was nach LICHTENTHALER & BUSCHMANN 1984 auf eine oxidative Beeinflussung hinweist, wie sie naturgemäß in größeren Höhen zu erwarten ist (RENNENBERG 1988). Die saisonalen Veränderungen und die Gesamtheit der untersuchten Parameter lassen jedoch keinen Einfluß anderer extremer Streßfaktoren, natürlicher oder anthropogener Herkunft, erkennen.

Die Nadeln des auf 1000 m Seehöhe gelegenen Baumes 2 weisen im Frühjahr ein von den anderen beiden Bäumen abweichendes Verhalten auf. Thiolgehalt und Aktivität der Glutathionreduktase verlaufen zumeist parallel (ESTERBAUER & GRILL 1978, GRILL & al. 1988b). Bei den Nadeln des Baumes 2 ist diese Übereinstimmung im Frühjahr 1988 aber nicht zu beobachten. Das Maximum des Thiolgehaltes ist beim Jg. 87 des Baumes 2 im April zu finden, jenes der Glutathionreduktase dagegen erst im Juni. Der Nadeliahrgang 86 weist im April ein Maximum des Thiolgehaltes und gleichzeitig ein ausgeprägtes Minimum der Enzymaktivität auf. Das bedeutet. daß die Aktivität der Glutathionreduktase während dieser Periode deutlich beeinträchtigt war. Verändern sich Xanthophyll- und Carotingehalt bei den beiden anderen Bäumen von Februar bis April gegenläufig, sind diese Veränderungen beim Nadeljahrgang 87 des Baumes 2 gleichgerichtet. Gleichzeitig weist dieser Jahrgang im April einen sehr hohen Xantohphyll/ Carotin-Quotienten auf, was als deutlicher Hinweis für Vergilbungen genommen werden kann (PFEIFHOFER & GRILL 1987). In demselben Zeitraum wurden an diesen Nadeln auch Veränderungen im Fluoreszenzverhalten festgestellt (LECHNER & BOLHÀR-NORDENKAMPF 1989). Die Nadeln des Baumes 2 weisen zudem im August die höchsten Ascorbinsäure- und die geringsten Pigmentgehalte auf.

Bei Belastung mit Ozon konnte eine deutliche Hemmung der Glutathionreduktase-Aktivität beobachtet werden (BERMADINGER & al. 1989). Von zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, daß Ozonbelastungen zu einer Erhöhung des Ascorbinsäuregehaltes führen können (BARNES 1972, LEE & al. 1984, MEHLHORN & al. 1986, OSSWALD & ELSTNER 1986b, OSS-

(181)

WALD & al. 1987, GRILL & al. 1988 a, BERMADINGER & al. 1989). Im Vergleich zu den Nadeln von Baum 1 sind bei den Nadeln des Standortes 2 die Quotienten  $\alpha$ - zu  $\beta$ -Carotin deutlich verringert, was ebenfalls auf eine oxidative Beeinflussung hindeutet (LICHTENTHALER & BUSCHMANN 1984). Die geringen Pigmentgehalte sind ein deutliches Zeichen einer Beeinflussung. Das für Fichten aus "neuartigen Waldschadensgebieten", die durch Photooxidantien geprägt sind, typische altersbedingte Verhalten, eine Abnahme des Pigmentgehaltes bereits nach dem 2. Jg. und danach erst ein neuerlicher Anstieg in den Pigmentgehalten (PFEIFHOFER & GRILL 1987, PFEIFHOFER & GRILL 1988), war bei den Nadeln von Baum 2 allerdings nicht zu beobachten.

Aufgrund des oben beschriebenen Merkmalskomplexes muß einer oxidativen Schadstoffkomponente am Standort 2 eine wesentliche Rolle an der Ausprägung dieser Merkmale zugewiesen werden. Das zusätzliche Wirken anderer, natürlicher oder anthropogener Streßfaktoren kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. Die im Frühighr zu beobachtenden Abweichungen im saisonalen Rhythmus lassen vermuten, daß der Baum während der physiologisch sehr sensiblen Phase vor und während des Austriebes einer außergewöhnlichen Streßbelastung ausgesetzt war. Gerade in dieser Periode überschritt der 98-Percentilwert für Ozon 0.15 mg O<sub>3</sub> m<sup>-3</sup>. wohingegen solche Überschreitungen beim Standort 3 nur im August und beim Standort 1 überhaupt nicht auftraten (GLATTES 1989). Eine deutliche SO<sub>2</sub>-Einwirkung ist an diesem Standort auszuschließen, da keinerlei Wachszerstörungen festgestellt werden konnten, wie sie bei SO2-Einfluß berichtet werden (HUTTUNEN & LAINE 1983, GRILL & al. 1987). Oxidative Beeinflussungen hingegen führen nicht zu einer Zerstörung der Epikutikularwachse (GÜNTHARDT-GOERG & KELLER 1987, BERMADINGER & al. 1988).

Die starken Beeinflussungen der Epikutikularwachse der Nadeln des Standortes 1 lassen auf das Einwirken einer sauren Schadstoffkomponente schließen. So berichten u. a. HUTTUNEN & LAINE 1983 und GRILL & al. 1987 von einer Wachszerstörung in Regionen mit hohen SO<sub>2</sub>-Belastungen. Auch durch Autoabgase (NOx) werden die Wachse beeinträchtigt (SAUTER & al. 1987). Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß SO<sub>2</sub> zu einer Erhöhung des Gehaltes an wasserlöslichen Thiolen führt (GRILL & ESTER-BAUER 1973, RENNENBERG 1984, MEHLHORN & al. 1986, KUNERT & HOFER 1987). Daher läßt der erhöhte Thiolgehalt der Nadeln aus der Oberkrone einen SO2-Einfluß am Standort 1 vermuten. Die im Vergleich zu den anderen Bäumen etwas verringerten Ascorbinsäuregehalte könnten ebenfalls auf eine SO<sub>2</sub>-Einwirkung zurückgeführt werden (vgl. GRILL & al. 1979, BERMADINGER & al. 1989). Neben SO<sub>2</sub> ist an diesem Standort jedoch auch mit dem Einfluß von Stickoxiden zu rechnen, die hier während des Winters in höheren Konzentrationen auftreten (Grenzwertüberschreitungen während der Wintermonate; GLATTES 1989).

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at (182)

Eine Differenzierung der drei Standorte aufgrund der Wirkung verschiedener Luftschadstoffe ist möglich. Dramatische Veränderungen und Abweichungen, die auf das extreme Einwirken natürlicher oder anthropogener Streßfaktoren hindeuten, sind aber an keinem der drei Bäume zu beobachten. Es muß aber immer bedacht werden, daß das Ausmaß der Schädigungen an Bäumen eines Standorts allerdings nicht nur durch die aktuellen Stressoren (anthropogen oder natürlich), sondern auch durch die aktuelle Resistenz mitbestimmt wird, die durch die Versorgung mit Wasser und Mineralstoffen, vorausgehende modifikatorische Anpassungen (Lichtund Temperaturanpassung) und durch die genetisch vorgegebene Reaktionsnorm (Genotyp) geprägt ist (WILD 1988).

Wie die Untersuchungen gezeigt haben, unterliegen die Gehalte an wasserlöslichen Thiolen, Ascorbinsäure, Pigmenten sowie die Glutathionreduktase-Aktivität sehr starken saisonalen Veränderungen. Der Grund ist u. a. in gravierenden funktionellen und strukturellen Veränderungen zu suchen, die während des Frühjahrs und Frühsommers in den Pflanzen vor sich gehen (SENSER & al. 1975, SOIKKELI 1978, GRILL & al. 1983, GRILL & PFEIFHOFER 1985, ZELLNIG & GAILHOFER 1989). Das bedeutet, daß auch die Entgiftungsmechanismen, die primär der Umsetzung intrazellulär gebildeter toxischer Sauerstoffspezies dienen (vgl. Abb. 1), einer entwicklungsphysiologischen Steuerung unterliegen (RENNENBERG 1988), Wie gezeigt werden konnte, kommt es vor und während des Austriebes innerhalb sehr kurzer Zeiträume zu gravierenden Veränderungen in den Gehalten dieser der Entgiftung dienenden Komponenten. Untersuchungen während dieses Zeitraumes sind nur schwer zu interpretieren, wenn man nicht sichergestellt hat, daß sich die Bäume in vergleichbaren entwicklungsphysiologischen Stadien befinden. Beachtet man diese Voraussetzungen, können Veränderungen im saisonalen Verlauf wertvolle Interpretationshilfen liefern. Derartige Untersuchungen sind aber, da die Probenahme mindestens alle vier Wochen erfolgen sollte, sehr zeit- und arbeitsintensiv. Zusätzlich muß bedacht werden, daß zur Beurteilung einer durch anthropogene Stressoren bedingten Beeinflussung die Untersuchung eines einzelnen Parameters (z. B. Pigmente) nicht ausreichend ist. Es ist notwendig, einen Merkmalskomplex zu erfassen (z. B. Thiole, Ascorbinsäure, Pigmente und Epikutikularwachse). Für flächendeckende, großräumige Untersuchungen ist ein derartiges Vorgehen aber kaum praktizierbar. Um entwicklungsbedingte Unterschiede möglichst zu minimieren, sollte daher eine Erfassung der besprochenen Entgiftungsmechanismen während des Sommers (August) erfolgen, da sich die Pflanzen dann in einer stabilen physiologischen Phase befinden.

#### Danksagung

Gedankt sei allen Mitarbeitern am Zentrum für Elektronenmikroskopie Graz für die Ermöglichung der REM-Untersuchungen.

(183)

Die Forschungsarbeit wurde durch die finanzielle Unterstützung seitens des Bundesministeriums für Wissenschaft und Forschung ermöglicht.

#### Literatur

- BARNES R. L. 1972. Effects of chronic exposure to ozone on soluble sugar and ascorbic acid contents of pine seedlings.-Can. J. Bot. 50: 215-219.
- BERMADINGER E., GRILL D. & GOLOB P. 1988. Influence of different air pollutants on the structure of needle wax of spruce (*Picea abies* [L.] KARST.). – GeoJournal 17. 2.: 289–293.
  - , GUTTENBERGER H. & GRILL D. 1989. The Hohenheim longterm experiment: physiological reactions of young spruces in model ecosystems. - Environ. Poll., im Druck.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF H. R. & LECHNER E. G. 1989. Saisonale und streßbedingte Modifikationen der photosynthetischen Kapazität von Fichten im Höhenprofil "Zillertal". B, Lichtabhängige CO<sub>2</sub>-Fixierung. – Phyton (Austria) 29 (3, Sonderband "Zillertal"): (207)–(227).
- BUI-NGUYEN M. H. 1980. Application of high-performance liquid chromatography to the separation of ascorbic acid from isoascorbic acid. – J. Chromatogr. 196: 163–165.
- DEMMIG B., WINTER K., KRÜGER A. & CZYGAN F.-Ch. 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. – Plant Physiol. 84: 218–224.
- ELSTNER E. F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. Ann. Rev. Plant Physiol. 33: 73-96.
- ESTERBAUER H. & GRILL D. 1978. Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of *Picea abies*. Plant Physiol. 61: 119–121.
  - , GRILL D. & WELT R. 1980. Der jahreszeitliche Rhythmus des Ascorbinsäuresystems in Nadeln von Picea abies. – Z. Pflanzenphysiol. 98: 393–402.
- FOYER Ch. H. & HALLIWELL B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. – Planta 133: 21–25.
- GLATTES F. 1989. Nähr- und Schadstoffgehalte von Nadelproben aus dem Höhenprofil "Zillertal". – Phyton (Austria) 29 (3, Sonderband "Zillertal"): (103)–(110).
  - , BOLHÀR-NORDENKAMPF H. R., GABLER K., LEITNER J., MAJER CH., PLATTNER J. & ZWERGER P. 1989. Die Biotope der Probebäume im Höhenprofil "Zillertal". – Phyton (Austria) 29 (3, Sonderband "Zillertal"): (15)–(37).
- GOODWIN T. W. 1980. The biochemistry of the carotenoids. Vol. I: Plants. Chapman and Hall, London New York.
- GRILL D. 1973. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Wachsstrukturen der Nadeln von Picea abies (L.) KARSTEN. – Micron 4: 146–154.
  - & ESTERBAUER H. 1973. Cystein und Glutathion in gesunden und SO<sub>2</sub>-geschädigten Fichtennadeln. – Eur. J. For. Path. 3: 65–71.
  - & PFEIFHOFER H. 1985. Carotinoide in Fichtennadeln. II. Quantitative Untersuchungen. – Phyton (Austria) 25: 1–15.
  - , ESTERBAUER H. & HELLIG K. 1982. Further studies on the effect of SO<sub>2</sub>pollution on the sulfhydril-systems of plants. – Phytopath. Z. 104: 264–271.
  - , & Welt R. 1979. Einfluß von SO<sub>2</sub> auf das Ascorbinsäuresystem der Fichtennadeln. Phytopath. Z. 96: 361-368.

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

## (184)

- , POLZ I. & PFEIFHOFER H. 1983. Chlorophyll und Chlorophyllabbau in Fichtennadeln. – Phyton (Austria) 23: 79–90.
- , KERN T., BERMADINGER E. & JÄGER H. J. 1988 a. Physiologische Reaktionen von Fichten in Inversionszonen. – Ges. f. Strahlenforschung-Bericht 17: 391–399.
- , PFEIFHOFER H., HALBWACHS G. & WALTINGER H. 1987. Investigations on epicuticular waxes of differently damaged spruce needles. – Eur. J. For. Path. 17: 246-255.
- , , TSCHULIK A., HELLIG K. & HOLZER K. 1988b. Thiol content of spruce needles at forst limits. - Oecologia 76: 294-297.
- GUNTHARDT-GOERG M. S. & KELLER Th. 1987. Some effects of longterm ozone fumigation on Norway spruce. II. Epicuticular wax and stomata. - Trees 1: 145-150.
- HALLIWELL B. 1984. Chloroplast metabolism. Clarendon Press, Oxford.
- HUTTUNEN S. & LAINE K. 1983. Effects of air borne pollutants on the surface wax structures of *Pinus sylvestris* needles. – Ann. Bot. Fennici 20: 79–86.
- JÄGER H. J. & KLEIN H. 1980. Biochemical and physiological effects of  $SO_2$  on plants. - Angew. Bot. 54: 337-348.
  - , WEIGEL H. J. & GRÜNHAGE L. 1986. Physiologische und biochemische Aspekte der Wirkung von Immissionen auf Waldbäume. – Eur. J. For. Path. 16: 98–109.
- KUNERT K. J. & EDERER M. 1985. Leaf aging and lipid peroxidation: the role of the antioxidants vitamin C and E. - Physiol. Plant. 65: 85-88.
  - & HOFER G. 1987. Geben Veränderungen des antioxidativen Systems von Pflanzen Hinweise auf die Wirkung von Luftschadstoffen? – Allg. Forstz. 27/ 28/29: 697-699.
- LEE E. H., JERSEY J. A., GIFFORD C. & BENNETT J. 1984. Differential ozone tolerance in soybean and snapbeans: analysis of ascorbic acid in O<sub>3</sub>-susceptible and O<sub>3</sub>resistant cultivars by high-performance liquid chromatography. – Environ. Exp. Bot 24: 331-341.
- LEVITT J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. 2nd. ed., Vol. 1 & 2. Academic Press New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco.
- LICHTENTHALER H. K. & BUSCHMANN C. 1984. Das Waldsterben aus botanischer Sicht. - G. Braun Karlsruhe.
- MEHLHORN H., SEUFERT G., SCHMIDT A. & KUNERT K. J. 1986. Effect of SO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> on productions of antioxidants in conifers. Plant Physiol. 82: 336–338.
- OSSWALD W. & ELSTNER E. F. 1986a. Mechanismen der pathologischen Pigmentbleichung bei Pflanzen. – Ber. Deutsch. Bot. Ges. 99: 341–365.
  - & 1986b. Fichtenerkrankungen in der Hochlage der Bayerischen Mittelgebirge. – Ber. Deutsch. Bot. Ges. 99: 313–339.
  - , SENGER H. & ELSTNER E. F. 1987. Ascorbic acid and glutathione contents of spruce needles from different locations in Bavaria. - Z. Naturforsch. 42c: 879-884.
- PFEIFHOFER H. 1989. Evidence for chlorophyll b and lack of lutein in Neottia nidusavis plastids. – Biochem. Physiol. Pflanzen 184: 55–61.
  - & GRILL D. 1987. Pigmentuntersuchungen an Fichten mit "klassischen" und "neuartigen" Waldschäden. – FIW-Bericht 1987: 124–134, hgg. vom Bundesministerium für Wissenschaften und Forschung, Wien.

(185)

- & 1988. Zur Rolle von Pigmentuntersuchungen in der biochemischen Diagnose von Schadwirkungen. In: FÜHRER E. & NEUHUBER F. (eds.), FIW-Symposium 1988. p. 290-291. – Wien.
- RENNENBERG H. 1984. The fate of excess sulfur in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 518-543.
  - 1988. Wirkung von Photooxidantien auf Pflanzen. Ges. f. Strahlenforschung-Bericht 17: 360-370.
- SAUTER J. J., KAMMERBAUER H., PAMBOR L. & HOCK B. 1987. Evidence for the accelerated micromorphological degradation of epistomatal waxes in Norway spruce by motor vehicle emissions. - Eur. J. For. Path. 17: 444-448.
- SENSER M., SCHÖTZ F. & BECK E. 1975. Seasonal changes in structure and function of spruce chloroplasts. - Planta 126: 1-10.
- SIEFERMANN-HARMS D. 1977. The xanthophyll cycle in higher plants. In: TEVINI M. & LICHTENTHALER H. K. (eds.). Lipids and lipid polymers in higher plants. pp. 218-230. – Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- SOIKKELI S. 1978. Seasonal changes in mesophyll ultrastructure of needles of Norway spruce (*Picea abies*). Can. J. Bot. 56: 1932–1940.
- STROTHER S. 1988. The role of free radicals in leaf senescens. Gerontology 34: 151-156.
- WILD A. 1988. Licht als Streßfaktor bei Waldbäumen. Naturw. Rdsch. 41: 93-96.
- WIMANLASIRI P. & WILLS R. B. H. 1983. Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fruit and vegetables by high performance liquid chromatography. – J. Chromatogr. 256: 368–371.
- ZELLNIG G. & GAILHOFER M. 1989. Feinstruktur der Chloroplasten von Picea abies verschiedener Standorte im Höhenprofil "Zillertal". – Phyton (Austria) 29 (3, Sonderband "Zillertal"): (147)–(161).

# **ZOBODAT - www.zobodat.at**

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1989

Band/Volume: 29\_3

Autor(en)/Author(s): Bermadinger Edith, Grill Dieter, Guttenberger Helmut

Artikel/Article: <u>Thiole</u>, <u>Ascorbinsäure</u>, <u>Pigmente und Epicuticularwachse in</u> <u>Fichtennadeln aus dem Höhenprofil "Zillertal"</u>. <u>163-185</u>