Die Überflutungstoleranz der Seebinse (Schoenoplectus lacustris (L.) Palla). IV, Dissimilation und "Energy charge" in Rhizomgewebeschnitten unter Normoxia, Hypoxia und Anoxia

Autor(en): **Brändle, Roland**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Botanica Helvetica**

Band (Jahr): **91 (1981)**

PDF erstellt am: **27.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-64300

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Botanica Helvetica *91:* 49–55 (1981)

Die Überflutungstoleranz der Seebinse (*Schoenoplectus lacustris* (L.) Palla) IV. Dissimilation und «Energy charge» in Rhizomgewebeschnitten unter Normoxia, Hypoxia und Anoxia

von *Roland Brändle*

Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Bern

Manuskript eingegangen am 2. April 1981

Einleitung

Die effizienteste Ausnutzung der Atmungssubstrate und des Sauerstoffes in der aeroben Dissimilation wird in der Endoxidation über das Cytochromsystem erzielt. In vielen pflanzlichen Geweben existieren andere, kein ATP liefernde Endoxidationsmechanismen, wie die cyanidresistente «Alternate oxidase» und die Phenoloxidasen. Die physiologische Bedeutung dieser Endoxidationen, insbesondere der «Alternate oxidase», ist umstritten (Lambers 1980). Alle drei Oxidasen konkurrieren um den verfügbaren molekularen Sauerstoff, so daß je nach Anteil am Sauerstoffverbrauch der Energiestoffwechsel beeinflußt werden kann.

Eine gute Kenngröße für den Energiestatus von Geweben ist die «Energy charge»

$$(\text{E.C.} = \frac{[\text{ATP}] + \frac{1}{2}[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}).$$

Sie ist u.a. auch ein Maß für die Aktivität von ATP verbrauchenden Enzymen (Atkinson 1976). Hohe Werte der «Energy charge» (0,7 — 0,9) fördern, intermediäre Werte (0,5 — 0,7) hemmen und niedrige Werte (<0,5) stoppen ATP konsumierende Prozesse. Werte unterhalb 0,5 führen in nicht ruhenden Geweben über kurz oder lang zum Zelltod. Die «Energy charge» und die metabolische Aktivität von Geweben sind miteinander korreliert (Pradet und Bomsel 1978).

Halmlose Rhizome der überflutungstoleranten Seebinse sind sauerstoffarm (Steinmann und Brändle 1981). Eine gute Ausnutzung geringer Sauerstoffkonzentrationen durch die Cytochromoxidase führt zu einer verbesserten Energiebereitstellung für ATP-konsumierende Prozesse, was für das aktive Überleben dieser Organe unter Sauerstoffknappheit ein entscheidender Vorteil sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit wird an Rhizomgewebeschnitten untersucht, welchen Anteil die verschiedenen Endoxidationen am Sauerstoffkonsum haben und welchen Einfluß die Sauerstoffkonzentration im Milieu auf diesen Anteil hat. Zudem können durch Bestimmungen von «Energy charge»-Werten Sauerstoffkonzentrationsbereiche ermittelt werden, die einen optimalen oder einen reduzierten Stoffwechsel ermöglichen.

Schließlich wird versucht, unter oekophysiologisch relevanten Bedingungen die niedrigsterreichbare «Energy charge» zu erfassen. Die Resultate werden im Hinblick auf die verschiedenen Anpassungsstrategien der Seebinse an die Überflutung diskutiert (Brändle 1980).

Material und Methoden

Als Versuchspflanzen dienten Exemplare der See- oder Teichbinse (*Schoenoplectus lacustris,* (L.) Palla), die im temperierten Gewächshaus kutiviert wurden. Die Messungen erfolgten bei 20 °C an frischen Rhizomschnitten von 500 μm Dicke aus Rhizomabschnitten, die zwischen zwei voll ausgebildeten Halmen lagen.

Die Sauerstoffaufnahmeraten aus dem Milieu, 0, 1 M Phosphatpuffer pH 7 in Anwesenheit von Inhibitoren, wurden in einer Rankelektrode gemessen (Rank Brothers, Cambridge). Als Inhibitoren wurden für die Cytochromoxidase KCN, für die «Alternate oxidase» SHAM (= Salicylhydroxamic acid) und für die Phenoloxidasen DIECA (= Na-diäthyldithiocarbamat) verwendet. Die enzymatischen Betimmungen von Alkohol, Lactat und Malat wurden in Gewebeextrakten plus Inkubationslösung mit Testmethoden für die Lebensmittelanalytik durchgeführt (Boehringer, Mannheim). Die zu diesen Versuchen gehörigen Sauerstoffaufnahmemessungen wurden auf einem Respirometer ausgeführt (Gilson, Middleton, Wisconsin).

Die Inkubation der Gewebeschnitte (~ 300 – 400 mg FG) bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen für die Messungen der «Energy charge» erfolgte in einer von Raymond and Pradet (1980) beschriebenen Glasapparatur mit Gasgemischen aus Druckflaschen. Ohne Inhibitorzusatz konnten die Schnitte in feuchter Atmosphäre gehalten und nach 60-minütiger Inkubationszeit mit Aether, gekühlt mit flüssigem Stickstoff, inaktiviert werden. Andernfalls wurden die Gewebeschnitte in der begasten Pufferlösung inkubiert und nachher sofort in 4 ml eiskalte TCA 0,6 M überführt und homogenisiert. Die Extraktion der Nukleotide erfolgte nach Raymond and Pradet (1980). Die Bestimmungen der Nukleotidkonzentrationen wurden jeweils in 50 μ1 Extrakt mit dem Luciferin-Luciferase-Komplex mittels einer für den Celltester M 1060 optimierten Methode ausgeführt (Lumac, Belgien: Application No. 507/518). Die Hilfsenzyme Pyruvatkinase und Myokinase stammten von Boehringer (Mannheim), die Nukleotide ATP, ADP und AMP als Test- und Standardsubtanzen von Sigma (St. Louis, USA). Die Resultate sind als Mittelwerte von n = 3, resp. 5 voneinander unabhängigen Experimenten dargestellt.

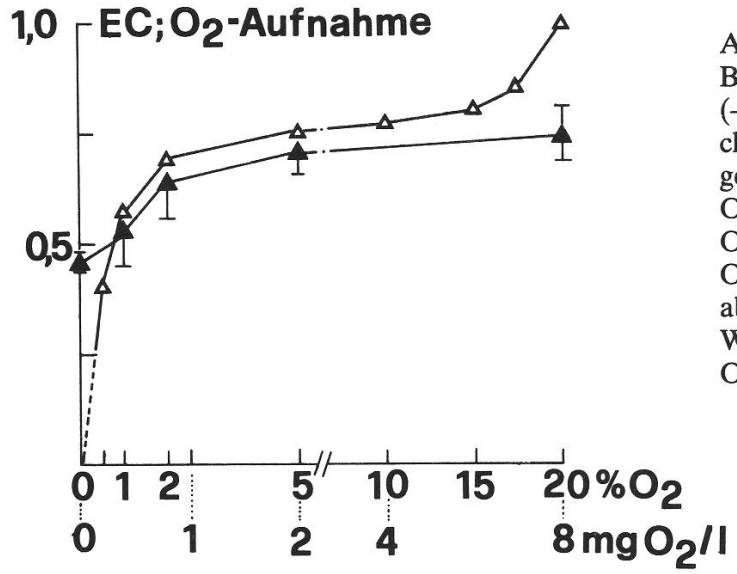

Abb.1
Beziehung zwischen der O_2-Aufnahme (—△—△—, n = 3) und der «Energy charge» (—▲—▲—, n = 5) von Rhizomgewebeschnitten in Abhängigkeit von der O_2-Konzentration im Milieu. Angabe der O_2-Aufnahme in relativen Einheiten, d.h. O_2-Aufnahme bei O_2-Sättigung = 1. Die absolute O_2-Aufnahme bei 20 °C und bei Winterrhizomen beträgt 108 ± (9) μg O_2/g FG.h.

Resultate

Die Abb. 1 stellt die Beziehung zwischen der Sauerstoffaufnahme und der «Energy charge» in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration im Milieu dar. Im Bereich von 1 % O_2 und ca. 10 % O_2 sind die Werte für die Sauerstoffaufnahme mit der «Energy charge» korreliert. Oberhalb 10 % Sauerstoff und unterhalb 1 % Sauerstoff sind Sauerstoffaufnahme und «Energy charge» nicht mehr korreliert, wie z.B. in keimenden Salatsamen (*Lactuca sativa,* Raymond and Pradet 1980). In luftgesättigter Lösung scheint die Sauerstoffaufnahmekapazität nicht ausgeschöpft zu sein.

Die Hemmung der Endoxidation von Gewebeschnitten in luftgesättigter Lösung durch KCN und SHAM ist konzentrationsabhängig. Die Tatsache, daß bei keinem Hemmstoff eine vollständige Hemmung auftritt, zeigt, daß alle drei Endoxidationen am Sauerstoffkonsum teilnehmen (Abb. 2). Inhibitorkonzentrationen von 1 mM KCN, resp. DIECA ergeben für die Cytochromoxidase und die Phenoloxidasen die maximale Hemmung der Sauerstoffaufnahme von 70 % resp. 19 %, währenddessen die «Alternate oxidase» durch 1 mM SHAM zu 20 % gehemmt wird.

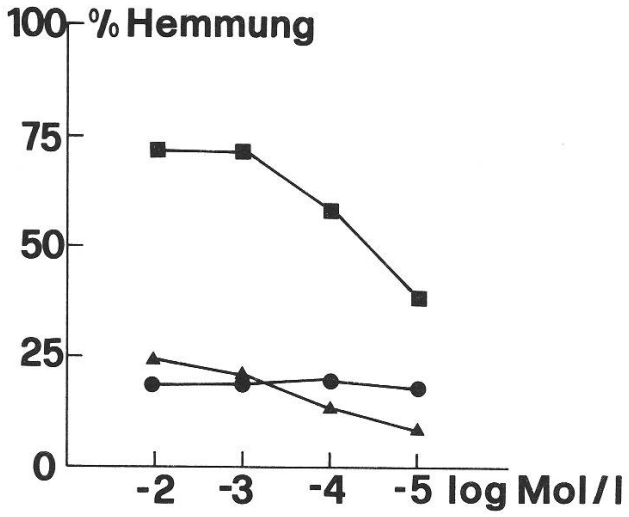

Abb. 2
Hemmung der O_2-Aufnahme durch Inhibitoren der Endoxidation (—■— KCN, —▲— SHAM, —●— DIECA) in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration. Milieu etwa 8 mg O_2/1. n = 3 für jede Inhibitorkonzentration.

Die Anteile der drei Endoxidationswege am Sauerstoffkonsum verändern sich mit abnehmender Sauerstoffkonzentration im Milieu (Abb. 3). Der Inhibitor der «Alternate oxidase» ist unterhalb 10 % O_2 (= 4 mg/1) wirkungslos, d.h. die «Alternate oxidase» ist nicht mehr aktiv. Unterhalb von 5 % O_2 (= 2 mg/1) scheinen auch die Phenoloxidasen gehemmt zu werden. Der Hauptelektronenfluß verläuft stets über die Cytochromoxidase, wobei mit abnehmender Sauerstoffkonzentration die Cyanidempfindlichkeit der Sauerstoffaufnahme eher gesteigert wird.

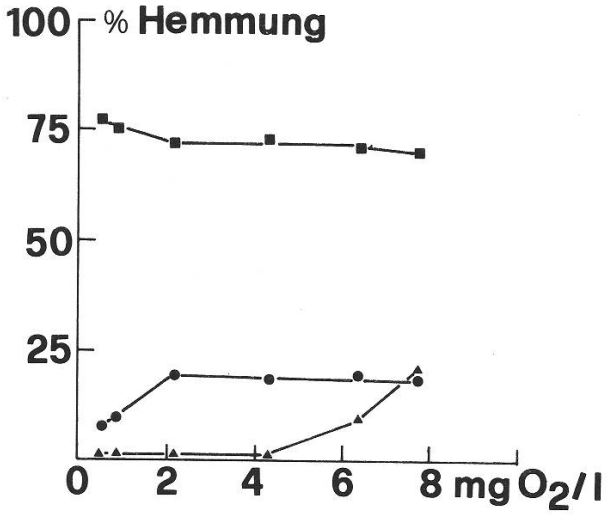

Abb. 3.
Prozentuale Hemmung der O_2-Aufnahme durch Inhibitoren der Endoxidation (—■— KCN, —▲— SHAM, —●— DIECA) in Abhängigkeit von der O_2-Konzentration im Milieu. Inhibitorkonzentrationen je 1 mM. n = 3 für jede ausgemessene O_2-Konzentration.

Auf den Energiestoffwechsel haben die «Alternate oxidase» und die Phenoloxidasen kaum einen Einfluß. Die Hemmungen der beiden Endoxidationen verändern das Niveau der «Energy charge» nicht signifikant. Dies im Gegensatz zur Hemmung der Cytochromoxidase durch KCN (Tabelle 1). Unterhalb 2 % O_2 (= 0,8 mg/1) werden vom Rhizomgewebe verschiedene Glykolyseendprodukte gebildet und z.T. ins Medium abgegeben. Erfaßbar sind Alkohol, Lactat und Malat (Tab. 2).

$[O_2]$	Kontrolle*	KCN	SHAM	DIECA
5 % = 2,0 mg/1	0,71 ± 0,04	0,54	0,69	0,71
21 % = 8,4 mg/1	0,74 ± 0,06	0,55	0,70	0,68

Tabelle 1: Beeinflussung der «Energy charge»-Werte durch 1 mM KCN, SHAM oder DIECA bei zwei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen im Medium (n = 3, *n = 5).

$[O_2]$	Alkohol	Lactat	Malat	Q O_2
0 % (N_2)	1,38	0,24	0,33	—
1 %	0,35	0,10	0,18	2,46 ± 0,40
2 %	Spuren	0	0	2,88 ± 0,32
5 %	0	0	0	3,08 ± 0,22
21 %	0	0	0	4,27 ± 0,54

Tabelle 2: Sauerstoffaufnahme (n = 5); Bildungsraten von Alkohol und Lactat (n = 3) und Veränderungen im Malatpool (n = 3) in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration im Milieu. Angaben in μM/g FG.h.

Diskussion

Die Untersuchungen wurden an frisch hergestellten Schnitten ausgeführt, um Aktivierungsprozesse auszuschließen, welche in gealterten Gewebeschnitten von Speicherorganen häufig auftreten und wenig über die Stoffwechselleistungen intakter Organe aussagen (Kahl 1974).

Die hohen «Energy charge»-Werte oberhalb von 2 % Sauerstoff (= 0,8 mg/1) deuten auf einen Stoffwechsel hin, der bezüglich ATP-Synthese und ATP-Verbrauch im Gleichgewicht steht und aktiv gehalten werden kann. Die Atmungssubstrate werden zwischen 2 % und etwa 10 % Sauerstoff am besten ausgenutzt. In diesem Bereich sind neben der Cytochromoxidase nur noch die Phenoloxidasen aktiv. Oberhalb von 10 % Sauerstoff werden überschüssige Reduktionsäquivalente gebildet, die im Sinne des von Lambers (1980) postulierten «Overflow»-Modells von der «Alternate oxidase» eiliminiert werden. Sie tragen nichts zur Energiegewinnung bei. Auf das Niveau der «Energy charge» oberhalb von 5 % Sauerstoff haben weder die «Alternate oxidase» noch die Phenoloxidasen einen Einfluß. Beide Oxidasen verschlechtern zwar die Ausnutzung der Reservestoffe, die im Rhizom der Flechtbinse aber nicht limitierend sind (Brändle 1980). Die leichte Erniedrigung der «Energy charge» ist vermutlich einer unspezifischen Giftwirkung der Hemmstoffe SHAM und DIECA zuzuschreiben.

Die Messung der «Energy charge» in Gewebeextrakten, die noch Inhibitorrückstände aufweisen, ist nicht ganz unproblematisch. Die Luciferase ist ein Cu-haltiges Enzym und wird durch DIECA gehemmt (Michelson 1978). Während der Aufarbeitung der Extrakte wird der Hemmstoff so weit verdünnt, daß er sich kaum mehr auf die Messung der Adeninnukleotide auswirkt.

Unterhalb von 2 % Sauerstoff dürfte die Sauerstoffkonzentration limitierend für die ATP-Synthese und damit auch für ATP konsumierende Prozesse werden. Die minimale Sauerstoffkonzentration, welche fermentative Prozesse verhindert, liegt zwischen 1 % und 2 % Sauerstoff. Sie wird als «Extinction point» bezeichnet und ist für ein Gewebe von verschiedenen Faktoren abhängig, wie z.B. von der Gaswegigkeit (Turner 1951). Die «Energy charge»-Werte fallen von dieser Konzentration an ab und erreichen unter Anoxia schließlich einen Wert von etwa 0,5. Gleichzeitig treten Alkohol, Lactat und oftmals vermehrt Malat auf, d.h. die Glykolyseendprodukte werden diversifiziert (Crawford 1978). Die Bedingungen, unter welchen Malat akkumuliert wird, sind unklar (Smith and ap Rees 1979, Crawford 1978). Unter Berücksichtigung der Bildungsraten der Glykolyseendprodukte ist es auch fraglich, ob die glykolytische Kettenphosphorylierung ausreicht, um die «Energy charge» auf dem intermediären Niveau zu halten. Es wäre möglich, daß noch weitere unbekannte Phosphorylierungsreaktionen ablaufen (vgl. Hochachka and Somero 1980).

Vermutlich sind Rhizome und Wurzeln von Sumpfpflanzen in der Natur nur in seltenen Fällen vollständig anaeroben Bedingungen ausgesetzt. Hypoxia dürfte der weitaus häufigere Zustand sein (Crawford 1981). An diese Bedingungen ist das Rhizomgewebe der Seebinse gut angepaßt. Die hohen «Energy charge»-Werte deuten dies an. Eine starke Drosselung ATP verbrauchender Prozesse findet vermutlich erst mit dem Auftreten von Glykolyseendprodukten statt, was unterhalb von 2 % Sauerstoff in der Umgebung der Fall ist. Der «Extinction point» liegt damit außerordentlich niedrig. Unterhalb dieser Grenze ist die Entwicklung neuer Sprosse zwar stark gebremst, aber immer noch möglich. Die Seebinse gehört zu den wenigen bis heute bekannten Pflanzen, die auch unter Anoxia austreiben können (Crawford 1981).

Zusammenfassung

Hemmstoffversuche haben ergeben, daß im Rhizomgewebe der Seebinse (*Schoenoplectus lacustris* (L.) Palla) mindestens drei Endoxidationsmechanismen vorkommen, nämlich die Cytochromoxidase, die «Alternate oxidase» und Phenoloxidasen. Mit abnehmender Sauerstoffkonzentration in der Umgebung wird bei etwa 10 % (= 4 mg/1) Sauerstoff die «Alternate oxidase» inaktiviert. Unterhalb von 5 % (= 2 mg/1) Sauerstoff werden auch die Phenoloxidasen gehemmt. Gleichzeitig nimmt die Cyanidempfindlichkeit der Atmung eher zu. Es scheint, daß der restliche Sauerstoff effizienter genutzt wird. Über einen weiten Sauerstoffkonzentrationsbereich kann die «Energy charge» über 0,7 gehalten werden. Erst unterhalb von 2 % (= 0,8 mg/1) Sauerstoff fällt sie stärker ab und erreicht unter Anoxia etwa den Wert von 0,5. In diesem Konzentrationsbereich treten Alkohol, Lactat und manchmal vermehrt Malat auf. Die intermediäre «Energy charge» kann, dank dem Stärkereichtum der Rhizome, über lange Zeit aufrechterhalten werden. Die Seebinsenrhizome scheinen daher bezüglich des Energiestoffwechsels gut an Hypoxia und Anoxia in ihrer Umgebung angepaßt zu sein.

Summary

Inhibitor experiments show that tissue slices of the bulrush rhizome *(Schoenoplectus lacustris* (L.) Palla) contain at least three different terminal-oxidation mechanisms: the cytochrome pathway, the alternate oxidase and phenolic oxidases. The alternate pathway is inactivated by lowering the oxygen concentration to about 10 % (= 4 mg O_2/1) in the environment. Below 5 % (= 2 mg O_2/1) oxygen the phenolic oxidases are also inhibited. Simultaneously the cyanide sensitivity of respiration increases slightly. The remaining oxygen seems to be used more efficiently for ATP synthesis. The energy charge is above 0,7 over a wide oxygen concentration range. It decreases below 2 % (= 0,8 mg O_2/1) oxygen in the environment to a value of about 0,5 under anoxia. At the same time ethanol, lactic acid and, in some cases, a higher malate pool can be detected. This intermediary energy charge can be maintained over a long period because of the high starch content of the rhizomes. The rhizome of the bulrush seems to be, from the point of view of the energy metabolism, well adapted to hypoxia and anoxia in the environment.

Verdankungen

Herrn Dr. A. Pradet (INRA, Bordeaux) danke ich für die vielen nützlichen Hinweise bezüglich der «Energy charge»-Messungen. Dank gebührt auch Hernn A. Berchtold (Bern) für die sorgfältige Ausführung der Mehrzahl der enzymatischen Bestimmungen.

Literatur

Atkinson, D.E. (1976): Adaptations of enzymes for regulation of catalytic function. In: Smellie, R.M.S. and Pennock, J.F.: Biochemical adapation to environmental change. The Biochemical Society, London, ISBN 0 904498 018.

Brändle, R. (1980): Die Überflutungstoleranz der Seebinse *(Schoenoplectus lacustris* (L.) Palla): II. Übersicht über die verschiedenen Anpassungsstrategien. Vierteljahrsschrift Naturforsch. Ges. Zürich, *125*, 177-185.

Crawford, R.M.M. (1978): Biochemical and ecological similarities in marsh plants and diving animals. Naturwiss., *65*, 194-201.

Crawford, R.M.M. (1981): Anaerobic respiration and flood tolerance in higher plants. In: Palmer, J.R.: Res. Symposium «Plant Respiration». Cambridge University Press (im Druck).

Hochachka, P.W. und Somero, G.N. (1980): Strategien biochemischer Anpassung. Thieme, Stuttgart-New York, ISBN 3 13 581301 0.

Kahl, G. (1974): Metabolism in plant storage tissue slices. Botanical Review, *40*, 263-314.

Lambers, H. (1980): The physiological significance of cyanide-resistent respiration in higher plants. Plant, Cell and Environment, *3*, 293-302.

Michelson, A.M. (1978): Purification and properties of *Pholas dactylus* luciferin and luciferase. In: Methods in enzymology, Vol. LVII: Bioluminescence and chemiluminescence, ISBN 0 12 181957 4, Academic Press, New York-San Francisco-London.

Pradet, A. and Bomsel, J.L. (1978): Energy metabolism in plants under hypoxia and anoxia. In: Hook, D. D. and Crawford, R. M.: Plant life in anaerobic environments. Ann Arbor, Michigan.

Raymond, P. and Pradet, A. (1980): Stabilisation of adenine nucleotide ratios at various values by an oxygen limitation of respiration in germinating lettuce *(Lactuca sativa)* seeds. Biochem. J. 190, 39-44.

Smith, A.M. and ap Rees T. (1979): Pathways of carbohydrate fermentation in the roots of marsh plants. Planta *146,* 327-334.
Steinmann, F. und Brändle, R. (1981): Die Überflutungstoleranz der See- oder Teichbinse *(Schoenoplectus lacustris):* III. Beziehungen zwischen der O_2-Versorgung und der «Adenylate energy charge» der Rhizome in Abhängigkeit von der O_2-Konzentration in der Umgebung. Flora *171:* 307-314.
Turner, J. S. (1951): Respiration (The Pasteur effect in plants). Ann. Rev. of Plant Physiol., *2,* 145-168.

Dr. Roland Brändle
Pfanzenphysologisches Institut der Universität
Altenbergrain 21
CH-3013 Bern