

Rasche Bestimmung des Manganmangels in Koniferennadeln durch ESR-Spektroskopie**

Von Peter Laggner*, Ruth Mandl, Annemarie Schuster, Monika Zechner und Dieter Grill

Mangan ist ein weitverbreitetes Spurenelement in grünen Pflanzen^[1] und spielt als spezifischer Cofaktor eine zentrale Rolle bei der lichtinduzierten Wasseroxidation im Photosystem II^[2,3]. Daneben findet sich in Blättern und Nadeln ein Mn^{II}-Pool, dem eine Funktion als Cofaktor in Superoxid-Dismutases zukommt^[4,5]. Ein phänomenologischer Zusammenhang zwischen Manganmangel und beeinträchtigter Baumvitalität ist in der Literatur ausführlich dokumentiert^[6,7]. Mn^{II} zeigt ein intensives, charakteristisches Sechslinien-ESR-Spektrum^[8,9], das sehr leicht von den Spektren anderer paramagnetischer Spezies des Photosyntheseapparates unterschieden werden kann. Diese spektroskopische Eigenschaft haben wir nun zur Entwicklung einer raschen und einfachen Methode zum Nachweis von Manganmangelscheinungen an Koniferennadeln genutzt. Die Resultate einer dreijährigen Untersuchungsreihe in österreichischen Waldbeständen zeigen den diagnostischen Wert dieser Methode auf.

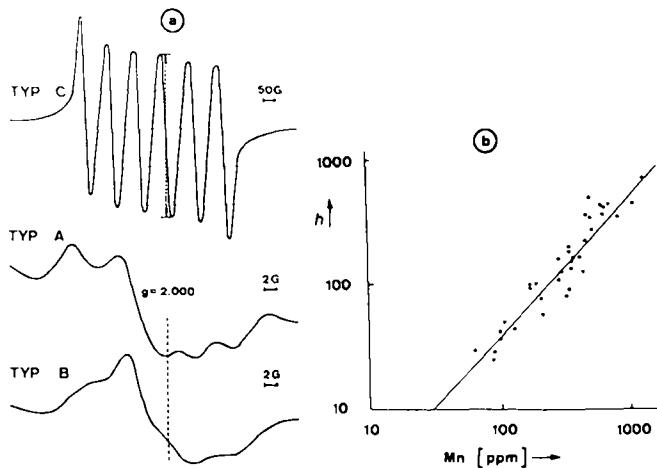


Abb. 1. a) Typische ESR-Spektren von Fichtennadeln (*P. abies*). Für die Aufnahme der Spektren wurde ein E104-A-X-Band-Spektrometer (Varian, Palo Alto, CA) verwendet. Die Spektren wurden von Hand geglättet. Typische Instrumenteneinstellungen waren: 3400 Gauß Feldstärke; Aufnahmebereich 100 kHz Feldmodulation: 1000/2 Gauß (für das Mn^{II}-Signal), 40/2 Gauß (für Signal A und B); 9.48 GHz Mikrowellenfrequenz; 10 mW Mikrowellenenergie; Aufnahmezeit/Zeitkonstante: 2 min/0.25 s (für Mn^{II}), 4 min/4 s (für Signal A und B). Die Nadelproben wurden 3-4 cm hoch in eine Quarzküvette mit 0.4 cm Innendurchmesser gefüllt. Die Packungsdichte nach leichtem Schütteln war $0.4 \pm 0.025 \text{ g cm}^{-3}$ ($\pm \text{S.D.}$ für $n = 14$). Waschversuche mit destilliertem Wasser und Metallkomplexbildnern (EDTA) schlossen eine Beeinträchtigung durch Oberflächenanlagerungen aus. b) Doppeltlogarithmische Auftragung der Signalhöhe h (in willkürlichen Einheiten) von Spektren des Typs C gegen Gesamtmgangehalt (vom Trockengewicht), durch Atomabsorptionsspektroskopie in 36 Nadelproben ermittelt. Die Gerade wurde durch Linearregression bestimmt ($r = 0.85$).

Generell können in Fichtennadeln (*P. abies*) drei Grundtypen von ESR-Signalen qualitativ unterschieden werden

(siehe Abb. 1a). Zwei von ihnen, von uns als Typ A und B bezeichnet, sind relativ schwach und scharf und erfordern bei der Aufnahme eine hohe Verstärkung und Auflösung. Der Spektrertyp A wurde früher dem Plastosemichinon-Radikalkation im Photosystem II^[10] zugeordnet; neueste Ergebnisse deuten jedoch mit größerer Wahrscheinlichkeit auf ein Tyrosin-Radikal hin^[11,12]. Typ B wird bei sichtlich erkrankten Bäumen beobachtet und ist vermutlich ein pathologisch verändertes Spektrum des Typs A^[13]. Der Spektrertyp C ist eindeutig dem Mn^{II} zuzuordnen. Das charakteristische, sich über etwa 500 Gauß erstreckende Sechslinien-Spektrum weist eine Hyperfeinaufspaltung von 95 Gauß auf; dies läßt auf eine teilweise Immobilisierung durch Bindung an größere Strukturbestandteile schließen^[14,15]. Abbildung 1b zeigt die Korrelation zwischen dem durch Atomabsorptionsmessungen bestimmten Gesamtgehalt an Mangan in den Nadeln und der ESR-Signalhöhe in Spektren vom Typ C. Aus der statistischen Regressionsgeraden kann der Gesamtmgangehalt im Bereich zwischen 50 und 1000 ppm direkt aus der Signalhöhe abgeschätzt werden. Zwischen 25 und 50 ppm dominiert Typ A, unter 25 ppm Typ B.

In Abbildung 2 sind die oben definierten Spektrertypen und die Baumvitalität jeweils als Funktion der Mangan-Konzentration dargestellt; die letztgenannte Beziehung wurde bereits von Kreutzer^[6,7] dokumentiert. Unter Berücksichtigung einer Überlappung der Spektrertypen einerseits und der diagnostischen Befunde andererseits kann man von einer guten Korrelation der Spektrertypen mit der dreigeteilten Vitalitätsskala sprechen.

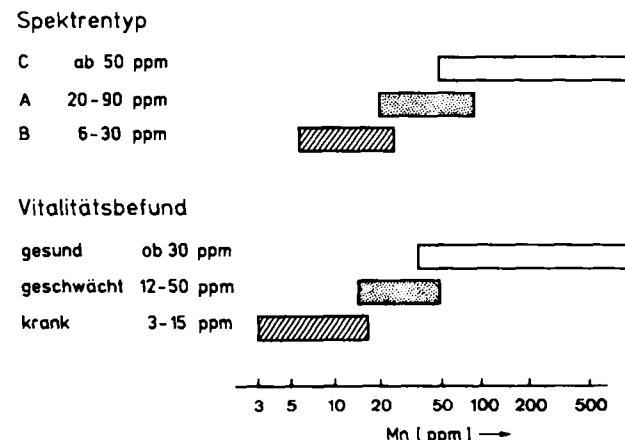


Abb. 2. Bereiche der Mangankonzentration (vom Trockengewicht) für die in dieser Studie definierten Spektrertypen (oben) und für die Vitalität nach Kreutzer [6, 7] (unten).

Es ist bekannt, daß das Mn^{II}-Signal photosynthetischer Organe eine deutliche Lichtabhängigkeit^[15,16] aufweist. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden allerdings nur die Dunkelsignale berücksichtigt, so daß diesem Effekt bei der hier getroffenen Klassifizierung nicht Rechnung getragen werden muß. Kontrollversuche haben gezeigt, daß die Mangangehalte mit zunehmendem Nadeljahrgang und außerdem zum Kronenbereich hin systematisch ansteigen; allerdings liegen diese Schwankungen unter 20% und sind wesentlich geringer als jene zwischen vitalitätsmäßig verschiedenen klassifizierten Bäumen. Somit sind die Schwankungen für die Gesamtbeurteilung unerheblich. An Proben von ein und demselben Baum wurden niemals Spektren aller drei Typen gefunden.

[*] Prof. Dr. P. Laggner, Dr. R. Mandl, A. Schuster, M. Zechner
Institut für Röntgenfeinstrukturforschung
der Österreichischen Akademie der Wissenschaften und
der Forschungsgesellschaft Joanneum
Steyrergasse 17, A-8010 Graz (Österreich)

Prof. Dr. D. Grill
Institut für Pflanzenphysiologie der Universität
Schubertring 51, A-8010 Graz (Österreich)

[**] Diese Arbeit wurde durch den Steiermärkischen Wissenschaftsfonds gefördert. Wir danken Dr. W. Kosmus, Institut für Analytische Chemie der Universität Graz, für die Unterstützung bei den Atomabsorptionsmessungen.

Abbildung 3a zeigt repräsentative Ergebnisse einer einjährigen Versuchsreihe mit monatlicher Probenahme in einem Beobachtungsgebiet, in dem alle drei Vitalitätsgruppen vertreten sind. Aus der Verteilung der Spektrentypen ist ersichtlich, daß der Anteil der Bäume ohne Manganmangel (Typ C) etwa unverändert blieb, während der Anteil an erkrankten Bäumen (Typ B) auf Kosten der geschwächten (Typ A) zunahm. Zu Beginn der Vegetationsperiode in den Monaten Mai und Juni wurden parallel Nadelproben von Jungtrieben und einjährigen Trieben vermessen. Die Jungtriebe wiesen generell jeweils den gleichen Spektrentyp auf wie die einjährigen, allerdings waren die Signale signifikant schwächer ausgeprägt; dies läßt sich durch einen erhöhten Wassergehalt der Jungtriebe erklären. Der Jahreslauf für einen einzelnen Baum ist in Abbildung 3b dargestellt.

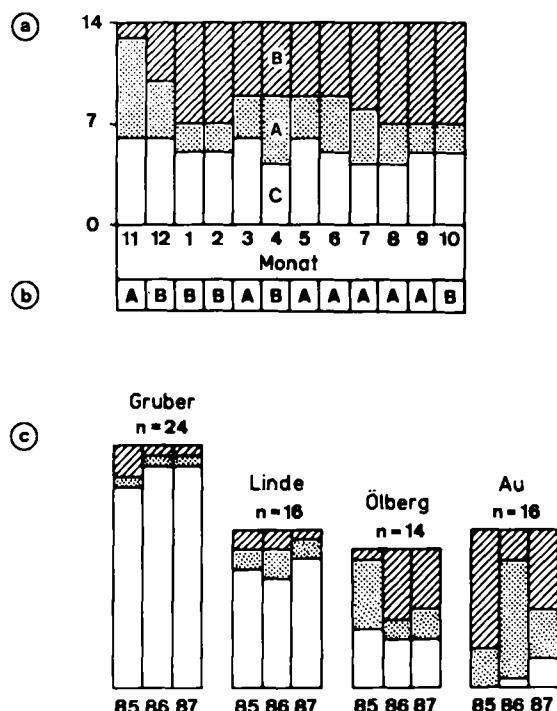


Abb. 3. a) Jahreszeitliche Abhängigkeit der spektralen Verteilung für ein Beobachtungsgebiet (Ölberg, 14 Bäume). Die Nadeln wurden von markierten Bäumen in monatlichen Abständen über einen Zeitraum von Oktober 1985 bis April 1986 entnommen. Die Zeichnung zeigt die Ergebnisse für einen Jahreslauf (November 1985–Oktober 1986). Die Zweige wurden in das Laboratorium gebracht und dort dunkel im Kühlraum (2–4°C) bis zur Vermessung gelagert, die spätestens nach 48 Stunden erfolgte. Innerhalb dieses Zeitraums wurden keine Veränderungen der ESR-Signale beobachtet. b) Charakteristischer Jahreslauf für einen geschwächten Baum, der ungefähr 15 Jahre alt ist und auf felsigem Grund unter Druck von Nachbarbäumen im Unterstand wächst und zusätzlich Anzeichen von Kronenverlichtung und Rotfäule aufweist. c) Spektrale Verteilung für vier Beobachtungsgebiete im Monat November dreier aufeinanderfolgender Jahre (1985–1987).

Die Resultate für vier Beobachtungsgebiete im gleichen Monat dreier aufeinanderfolgender Jahre sind in Abbildung 3c zusammengefaßt. Im allgemeinen stimmen die spektroskopischen Befunde gut mit der von Forstbehörden getroffenen Einteilung in Belastungszonen überein. So korreliert der sehr hohe Anteil des Typs C in der Region „Gruber“ gut mit der dort herrschenden geringen Belastung, während die Ergebnisse der Region „Au“ die schlechten Gegebenheiten für Fichten in städtischer Umgebung widerspiegeln.

Unabhängig von den spektroskopischen Resultaten wurden alle Probenbäume nach pflanzenphysiologischen Standardkriterien beurteilt. Abbildung 4 zeigt die Gegenüberstellung dieser Befunde und der Spektraltypen am Beispiel des Untersuchungsgebietes „Ölberg“. Bei allen Bäumen, die mit zwei oder mehr Stressfaktoren behaftet sind, tritt starker Manganmangel auf, wie er dem Spektraltyp B entspricht, während Bäume mit Spektren des Typs C durchweg gute Vitalität haben. Bäume, die im Unterstand wachsen, aber keine sichtbaren Mängelscheinungen aufweisen, zeigen Spektren des Typs A. Diese systematische

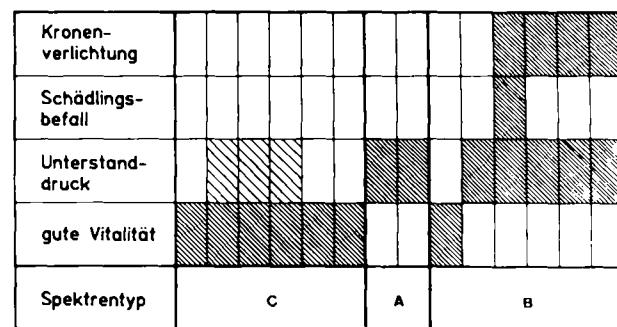


Abb. 4. Korrelation zwischen sichtbaren Risikofaktoren und Spektraltypen für 14 Bäume im Gebiet „Ölberg“.

Übereinstimmung wurde auch für die anderen Beobachtungsgebiete gefunden. Obwohl wir nicht ausschließen können, daß es erkrankte Bäume mit hinreichender Manganversorgung gibt, kann nach unseren Befunden der positive Schluß gezogen werden, daß Manganmangel, der durch das Fehlen des Spektraltyps C nachgewiesen wird, ein guter und allgemein gültiger Indikator für Baumerkrankungen ist.

Die bemerkenswert gute Übereinstimmung zwischen dem Auftreten des dominanten Mn^{II}-Spektrums (Typ C) und einer intakten Vitalität fordert tiefere pflanzenphysiologische Betrachtungen heraus. Mangan liegt im Photosystem II drei- und vierwertig vor^[2, 31]; diese höheren Oxidationsstufen sind für die ESR-Spektroskopie bei Raumtemperatur „unsichtbar“. Dies legt den Schluß nahe, daß das spektroskopisch „sichtbare“ Mn^{II} für die Photosyntheseaktivität keine essentielle Rolle spielt. Nach neuesten Ergebnissen^[17] verändert Belichtung von Fichtennadeln die Stärke des Mn^{II}-Signals. Daraus könnte abgeleitet werden, daß ein Überschuß an Mangan benötigt wird, um das Redoxgleichgewicht im Photosyntheseapparat aufrecht zu erhalten; dieser Mn^{II}-Pool könnte aber auch als Radikalfänger dienen und so vor photooxidativen Reaktionen schützen.

Für den flächendeckenden Einsatz sind nur leicht und schnell anwendbare Untersuchungsmethoden geeignet. So ist das Hauptziel dieser Arbeit auch nicht in einer sehr genauen Mn-Bestimmung zu sehen, sondern in der diagnostischen Auswertung der spektroskopischen Befunde.

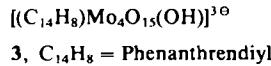
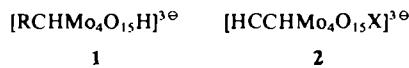
Trotz der dargelegten Beziehung zwischen Vitalitätsgrad und spektroskopisch bestimmbarer Mn^{II}-Konzentration darf nicht unerwähnt bleiben, daß eine unterschiedliche, standortabhängige Mn^{II}-Verfügbarkeit im Boden den Mangangehalt der Nadeln beeinflussen kann^[18]. Zur Aufklärung dieser Einflüsse und anderer, kombinierter Umwelteffekte bietet die hier beschriebene, einfache und rasche ESR-Methode ein attraktives Hilfsmittel.

- [1] P. J. Kramer, T. T. Kozlowsky: *Physiology of Woody Plants*, Academic Press, London 1979.
 - [2] B. Kok, R. Radmer, C. F. Fowler, *Annu. Rev. Biochem.* 44 (1979) 409.
 - [3] T. Kambara, Govindjee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 6119.
 - [4] J. Amesz, *Biochim. Biophys. Acta* 726 (1983) 1.
 - [5] D. C. McCain, J. L. Markley, *Biophys. J.* 48 (1985) 687.
 - [6] K. Kreutzer, *Forstwiss. Centralbl.* 89 (1970) 275.
 - [7] K. Kreutzer, *Forstwiss. Centralbl.* 91 (1972) 80.
 - [8] N. M. Atherton: *Electron Spin Resonance. Theory and Applications*, Wiley, New York 1974.
 - [9] H. M. Swartz, J. R. Bolton, D. C. Borg: *Biological Applications of Electron Spin Resonance*, Wiley-Interscience, New York 1972.
 - [10] P. J. O'Malley, G. T. Babcock, R. C. Prince, *Biochim. Biophys. Acta* 766 (1984) 283.
 - [11] R. J. Debus, B. A. Barry, G. T. Babcock, L. McIntosh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 427.
 - [12] B. A. Barry, G. T. Babcock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 7099.
 - [13] H. B. Stegmann, H. J. Ruff, K. Scheffler, *Angew. Chem.* 97 (1985) 407; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 425.
 - [14] R. E. Blankenship, K. Sauer, *Biochim. Biophys. Acta* 357 (1974) 252.
 - [15] M. Dunach, M. Seigneuret, J. Rigaud, E. Padros, *Biochemistry* 26 (1987) 1179.
 - [16] Y. Siderer, R. Malkin, R. Poupko, Z. Luz, *Arch. Biochem. Biophys.* 179 (1977) 174.
 - [17] H. B. Stegmann, P. Schuler, H. J. Ruff, unveröffentlicht.
 - [18] W. Nebe, *Arch. Forstwes.* 16 (1967) 109.

Bildung eines oxalat-gefüllten Hohlraums im reduzierten achtkernigen Polyoxomolybdat $[(n\text{-C}_4\text{H}_9)_4\text{N}]_2\text{Mo}_8\text{O}_{16}(\text{OCH}_3)_8(\text{C}_2\text{O}_4)]$ aus $\alpha\text{-}[(n\text{-C}_4\text{H}_9)_4\text{N}]_4\text{Mo}_8\text{O}_{26}]$ und Rhodizonsäure**

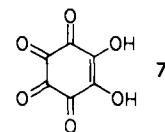
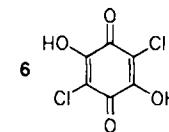
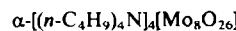
Von *Qin Chen, Shuncheng Liu und Jon Zubieta*

Wechselwirkungen zwischen Polyoxometallat-Clustern und organischen Substraten interessieren unter anderem wegen der Strukturverwandtschaft von Polyoxo-Anionen und festen Oxiden^[1-4]. Im Falle der Polyoxomolybdat-Carbonyl-Wechselwirkungen wird normalerweise eine Carbonylgruppe in eine Molybdän-Sauerstoff-Bindung eingeschoben^[5-7]. Die Synthesen von Organooxomolybdaten 1 mit Acetal^{-[5]}, 2 mit Diacetal^{-[6]} und 3 mit Diketalstruktur^[7] wurden unter dem Aspekt von Bindungsstellen für Säure-Base-Paare und als Modelle für die Bindung von Substraten an feste Oxidoberflächen diskutiert^[8]. Die Produkte

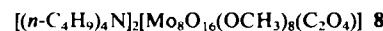


derartiger Molybdat-Carbonyl-Reaktionen hängen jedoch auch sehr stark von der Natur der organischen Ausgangsverbindung ab, wie anhand der Isolierung des Oxalatodimolybdat **4** gezeigt werden konnte. Die Verbindung entsteht bei der Reaktion des Komplexes **5** mit Chloranilsäure **6** in Methanol¹⁷. Diese Beobachtung legt nahe, daß sich bei Anwesenheit von organischen Resten, welche eine kationische Abgangsgruppe stabilisieren können, direkt an die Carbonyl-Insertion eine Spaltung des Liganden anschließt. Um die Allgemeingültigkeit der Carbonyl-Inser-

tion mit Spaltung des Liganden für die Polyoxomolybdat-Carbonyl-Chemie zu prüfen, haben wir die Reaktion des Molybdat 5 mit Rhodizonsäure 7 untersucht.



Die Umsetzung von 5 mit 7 ergibt eine hellgrüne, kristalline, diamagnetische Verbindung der analytischen Zusammensetzung **8**^[9]. Das IR-Spektrum von **8** zeigt eine



Banden bei 2930 cm^{-1} , die der CH-Streckschwingung der Methoxygruppen zuzuordnen ist, sowie starke Absorbtionen bei 1665 und 1543 cm^{-1} , die den Carbonylstreckschwingungen $\nu(\text{C}=\text{O})$ nicht äquivalenter Carbonylgruppen entsprechen. Die Bande bei 972 cm^{-1} wird der Streckschwingung $\nu(\text{Mo}=\text{O}_i)$ zugeordnet (O_i = endständige Oxogruppe); die Lage der Absorbtionen deutet darüber hinaus darauf hin, daß die Molybdänzentren der Mo^{VI} -Startverbindung reduziert worden sind. Die Bande bei 815 cm^{-1} zeigt die Gegenwart von verbrückenden Oxogruppen an ($\text{Mo}-\text{O}_h-\text{Mo}$).

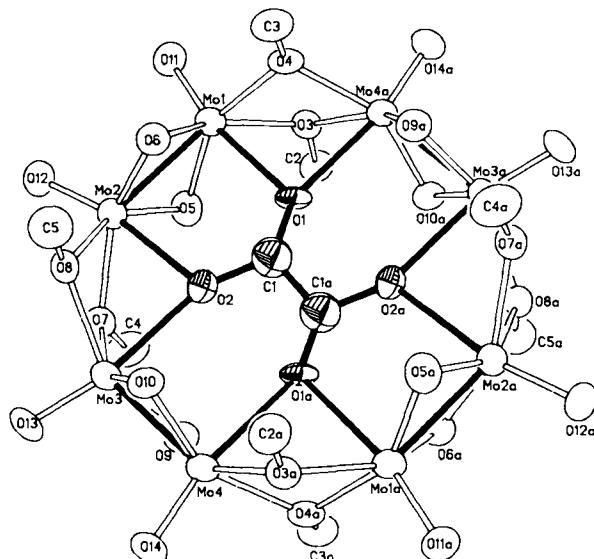


Abb. 1. Struktur des Dianions $[\text{Mo}_8\text{O}_{16}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2(\text{C}_2\text{O}_4)]^{2-}$ von 8 im Kristall. Ausgewählte Bindungslängen [Å] und -winkel [°]: Mo1-O1 2.367(7), Mo2-O2 2.377(7), Mo3-O2 2.385(8), Mo3-Ola 2.367(7), Mo-O₆ 1.678(11) (Durchschnittswert), Mo-O₆ 1.932(12) (Durchschnittswert), Mo-O(Methoxy) 2.106(11) (Durchschnittswert), Mo1-Mo2 2.582(2), Mo2-Mo3 3.262(1), Mo3-Mo4 2.574(2), Mo4-Mola 3.312(1), C1-O1 1.25(2), C1-O2 1.37(2), C1-Cl1 1.43(2); O3-Mo1-O4 71.4(3), O5-Mo1-O6 94.3(3), O9-Mo3-O10 94.2(3), O3a-Mo4-O4a 71.2(3), O9-Mo4-O10 94.5(3), Mo-O₆-Mo 83.7(5) (Durchschnittswert), Mo-O(Methoxy)-Mo 101.7(6) (Durchschnittswert). Abkürzungen: O, endständige Oxogruppe, O₆ verbrückende Oxogruppe, O(Methoxy) über O verbrückende Methoxygruppe.

Das komplexe Anion von Verbindung **8** (Abb. 1)^[10] besteht aus einem Achteck aus Molybdänatomen, die abwechselnd von zwei Methoxy- oder zwei Oxogruppen

(*) Prof. Dr. J. Zubietar, Q. Chen, S. Liu

Mr. B. J. Zadka, Q. C.

State University of New York at Albany

Albany, NY 12222 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation (Grant CHE8514634 für J. Z.) gefördert.