

# Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen und Begriffe . . . . .	III
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Stoffwechsell Aufgaben der Zellkompartimente</b>	<b>4</b>
2.1. Aufbau einer Pflanzenzelle . . . . .	4
2.2. Chloroplasten . . . . .	5
2.2.1. Photosysteme und Reparaturzyklus gegen Photoinhibition . . . . .	5
2.2.2. Elektronentransportkette und linearer Elektronentransport . . . . .	6
2.2.3. Zyklischer Elektronentransport . . . . .	8
2.2.4. Pseudozyklischer Elektronentransport (Mehler-Reaktion) . . . . .	8
2.2.5. Stickstoffassimilation . . . . .	8
2.2.6. Malat-Ventil und Triosephosphat-3-Phosphoglycerat-Shuttle . . . . .	9
2.2.7. Photorespiration . . . . .	9
2.3. Mitochondrien . . . . .	9
2.3.1. Elektronentransportkette und ATP-Bildung . . . . .	10
2.3.2. Alternative Oxidase . . . . .	11
2.3.3. Sauerstoffverbrauch . . . . .	12
2.4. Peroxisomen und ihre Rolle bei der Photorespiration . . . . .	12
2.4.1. Reaktionsschritte der Photorespiration . . . . .	12
2.4.2. Nutzen der Photorespiration . . . . .	14
2.5. Austausch von Reduktionsäquivalenten . . . . .	14
2.6. Darstellung der Stoffwechselprozesse in C <sub>3</sub> -Pflanzen . . . . .	16
<b>3. Material und Meßsysteme</b>	<b>19</b>
3.1. Verwendete Pflanzen . . . . .	19
3.1.1. Buschbohne ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) . . . . .	19
3.1.2. Mais ( <i>Zea mays</i> L., Sorte Helix) . . . . .	20
3.2. Fluoreszenzmessungen . . . . .	20
3.2.1. Fluoreszenzentstehung . . . . .	20
3.2.2. Quenchingmechanismen . . . . .	21

3.2.3. Yieldmessung . . . . .	22
3.2.4. Methoden der Fluoreszenzmessung . . . . .	23
3.3. Sauerstoffmessungen mit der Clark-Elektrode . . . . .	32
3.4. Absorptionsmessungen bei $\lambda = 505 \text{ nm}$ . . . . .	35
<b>4. Resistenz gegenüber Lichtstreß</b>	<b>37</b>
4.1. Stand der Forschung . . . . .	37
4.1.1. Untersuchung der mit Photosystem II verbundenen Schutzmechanismen	38
4.1.2. Lipidperoxidation und Aktivität von radikalfangenden Enzymen . . .	39
4.1.3. Unterschiedliche Aktivität der Mehler-Reaktion . . . . .	40
4.1.4. Unterschiedliche Gruppen von PS I-Akzeptoren . . . . .	41
<b>5. Lokalisierung der Stickstoffassimilation in den verwendeten Buschbohnen</b>	<b>45</b>
<b>6. Unterschiede in der Blattmorphologie</b>	<b>50</b>
6.1. Anzahl der Stomata und Zellen pro Blattfläche . . . . .	50
6.2. Anzahl der Reaktionszentren . . . . .	53
6.3. Chlorophyllgehalt und Absorptionskoeffizient . . . . .	54
6.4. Übersicht der Ergebnisse . . . . .	56
<b>7. Adaption an Schwachlicht- und Starklichtbedingungen</b>	<b>58</b>
7.1. Fluoreszenzmessungen an Schwachlichtpflanzen . . . . .	58
7.2. Fluoreszenzmessungen an Starklichtpflanzen . . . . .	60
7.3. Photoinhibitions-Quenching . . . . .	62
7.4. Absorptionsmessungen bei $\lambda = 505 \text{ nm}$ . . . . .	64
<b>8. Vergleich von Gas- und Elektronenflüssen</b>	<b>66</b>
8.1. Das Brooks-Farquhar-Modell . . . . .	66
8.2. Unterschiede in $\Gamma^*$ bei Nitrat- und Ammoniumernährung . . . . .	67
8.3. Vergleich der Elektronenflüsse $J_{E,F}$ und $J_{E,G}$ . . . . .	73
8.4. Zusammenfassung . . . . .	78
<b>9. Umschalten der Rubisco von <math>\text{CO}_2</math>- auf <math>\text{O}_2</math>-Bindung</b>	<b>80</b>
9.1. Ursache für die Abnahme der Sauerstoffrate . . . . .	80
9.2. Messungen bei RuBP-Limitierung . . . . .	82
9.3. Messungen bei Rubisco-Limitierung . . . . .	84
9.4. Messungen unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen . . . . .	85
9.5. Übersicht der Ergebnisse . . . . .	86
9.6. Schnelle und langsame Rückstellkomponente . . . . .	90
9.7. Elektronenfluß und Sauerstoffentwicklung bei Maisblättern . . . . .	92
9.7.1. $\text{CO}_2$ -Metabolismus in $\text{C}_4$ -Pflanzen . . . . .	92

9.7.2. Flüsse unter CO <sub>2</sub> -Verarmung bei Mais . . . . .	94
<b>10. Versuche zur Identifikation der beteiligten mitochondrialen Wege</b>	<b>97</b>
10.1. Inhibition mitochondrialer Funktionen . . . . .	97
10.2. Auswirkungen der Inhibition auf die photosynthetischen Parameter . . . . .	98
10.3. Lichtstimulierte Dunkelatmung (LEDR) in älteren Blättern . . . . .	99
10.4. Lichtstimulierte Dunkelatmung nach Inhibition . . . . .	102
10.5. Stimulierbarkeit der Dunkelatmung unter Starklichtanzucht . . . . .	104
10.6. Anzucht unter Starklicht und erhöhtem CO <sub>2</sub> -Gehalt . . . . .	106
10.7. Vergleich von CO <sub>2</sub> - und O <sub>2</sub> -Gasflüssen im Dunkeln . . . . .	107
10.8. Dunkelatmung nach Oligomycin-Vergiftung in älteren Blättern . . . . .	109
<b>11. Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>111</b>
11.1. Detaillierteres Bild über die Rolle von PS II-Schädigungen . . . . .	111
11.2. Export von Reduktionsäquivalenten aus den Chloroplasten . . . . .	112
11.3. Mögliche Entstehungsorte für Radikale außerhalb des Chloroplasten . . . . .	114
11.4. Metabolische Wege in den nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen . . . . .	115
<b>12. Fazit und Ausblick</b>	<b>120</b>
<b>13. Zusammenfassung</b>	<b>123</b>
<b>A. Theoretischer Hintergrund der FC-Maschine</b>	<b>126</b>
A.1. FC-Fluß als Summe photochemischer und thermischer Flüsse . . . . .	126
A.2. Zusammenhang zwischen J <sub>a</sub> , den Ratenkonstanten und dem Redox-Zustand von PS II . . . . .	128
A.3. Formale Identität von J <sub>a</sub> und 1/F . . . . .	129
A.4. Extremwerte der Flüsse nach Dunkeladaption und unter sättigendem Licht .	129
A.5. Der Genty-Parameter . . . . .	130
A.6. Der Skalierungsfaktor . . . . .	130
A.7. Die traditionellen Quenching-Parameter . . . . .	131
A.8. Die Berechnung von Q . . . . .	131
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>133</b>



## Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen und Begriffe

A	gemessene CO <sub>2</sub> -Aufnahme
ADP	Adenosindiphosphat
AL	Aktinisches Licht
AO	Alternative Oxidase
ATP	Adenosintriphosphat
Chl	Chlorophyll
C <sub>C</sub>	CO <sub>2</sub> -Konzentration im Chloroplasten
C <sub>i</sub>	CO <sub>2</sub> -Konzentration im interzellulären Gasraum
DA <sub>0</sub>	Rate der O <sub>2</sub> -Dunkelatmung ohne Vorbeleuchtung
DA <sub>I</sub>	Rate der lichtstimulierten O <sub>2</sub> -Dunkelatmung
ETC	lineare Elektronentransportkette
F	Fluoreszenz (gemessen mit dem PAM)
F <sub>0</sub>	minimale Fluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand
F' <sub>0</sub>	minimale Fluoreszenz im helladaptierten Zustand
FC	Fluorescence Clamp
Fd	Ferredoxin
F <sub>M</sub>	maximale Fluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand
F' <sub>M</sub>	maximale Fluoreszenz im helladaptierten Zustand
Φ <sub>e</sub>	Genty-Parameter
I	Lichtintensität
g <sub>C</sub>	Calvin-Zyklus-Leitfähigkeit für CO <sub>2</sub>
g <sub>m</sub>	Mesophyll-Leitfähigkeit für CO <sub>2</sub>
GOGAT	Glutaminoxogluterataminotransferase
GS	Glutaminsynthase
g <sub>s</sub>	stomatäre Leitfähigkeit für CO <sub>2</sub>
J <sub>0</sub>	maximaler Exzitonenfluß im dunkeladaptierten Zustand
J' <sub>0</sub>	maximaler Exzitonenfluß im helladaptierten Zustand
J <sub>a</sub>	Exzitonenfluß (gemessen mit der FC-Maschine)
J <sub>B</sub>	Fluß von Reduktionsäquivalenten aus dem Chloroplasten
J <sub>E,F</sub>	Elektronenfluß (berechnet aus der Fluoreszenz)
J <sub>E,G</sub>	Elektronenfluß (berechnet aus den Gasflüssen)
J <sub>M</sub>	minimaler Exzitonenfluß im dunkeladaptierten Zustand
J' <sub>M</sub>	minimaler Exzitonenfluß im helladaptierten Zustand
k <sub>f</sub>	Ratenkonstante der Fluoreszenz
k <sub>p</sub>	Ratenkonstante der photochemischen Deaktivierung
k <sub>t</sub>	Ratenkonstante der thermischen Deaktivierung
LEDR	Light Enhanced Dark Respiration

LHC	Light Harvesting Complex
MDHA	Monodehydroascorbat
MDH	Malat-Dehydrogenase
ML	Meßlicht
NADP	Nicotinadenindinucleotidphosphat
NiR	Nitritreduktase
NR	Nitratreduktase
OAA	Oxalacetat
OP	Operationsverstärker
P680, P700	Reaktionszentrums-molekül von PS II bzw. PS I
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGA	3-Phosphoglycerat
PQ	Plastoquinon
PS I, PS II	Photosystem I bzw. II
Q <sub>A</sub>	primärer Akzeptor von PS II
q <sub>E</sub>	Energy-Quenching
q <sub>N</sub>	nichtphotochemisches Quenching
q <sub>I</sub>	Photoinhibitions-Quenching
q <sub>P</sub>	photochemisches Quenching
R <sub>B</sub>	lichtabhängige CO <sub>2</sub> -Entwicklung
R <sub>d</sub>	(konstanter) CO <sub>2</sub> -Fluß aus der Lichtatmung
R <sub>n</sub>	CO <sub>2</sub> -Dunkelatmung
R <sub>p</sub>	CO <sub>2</sub> -Fluß aus der Photorespiration
Rubisco	Ribulosebisphosphat-Carboxylase
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat
RZ	Reaktionszentrum
S&H	Sample and Hold-Baustein
SHAM	Salicylhydroxamic Acid
SOD	Superoxiddismutase
TP	Triosephosphat
UQ	Ubiquinon
V <sub>C</sub>	CO <sub>2</sub> -Fluß aufgrund der Carboxylierung
V <sub>O</sub>	O <sub>2</sub> -Fluß aufgrund der Oxygenierung

# 1. Einleitung

Solare Strahlungsenergie, die bei der Photosynthese Voraussetzung für die Umwandlung in chemische Energie ist, kann für die Pflanzen auch schädlich sein. Der photosynthetische Apparat kann in seiner Funktion beeinträchtigt oder sogar zerstört werden.

Es wurde beobachtet, daß eine unterschiedliche Resistenz gegenüber hohen Lichtintensitäten auch auf einer unterschiedlichen Stickstoffernährung der Pflanzen mit Nitrat oder Ammonium beruht (Magalhaes und Wilcox, 1983). So sind nitraternährte Pflanzen resistenter gegenüber Lichtstreß als ammoniumernährte. Nitrat hat jedoch den Nachteil, daß es als Dünger leichter aus den Böden ausgewaschen wird.

Viele Untersuchungen befaßten sich bereits damit, die Ursachen der stickstoffbedingten Lichtstreßresistenz zu bestimmen. Auch ein gemeinsames DFG-Projekt der Kieler Arbeitsgruppe für Biophysik und des Instituts für Pflanzenernährung hat diese Fragestellung als Schwerpunkt.

Bei Lichtstreßuntersuchungen konzentrierte sich das Interesse stets auf Photosystem II und die Reaktionen innerhalb des Chloroplasten. Der Grund dafür ist zum einen, daß PS II mit dem empfindlichen D1-Protein von Lichtstreß unmittelbar betroffen ist (Andersson et al., 1992; Barber und Andersson, 1991; Baroli und Melis, 1996). Es wurde vermutet, daß diese Schädigung sowie der damit verbundene Reparaturzyklus in nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

Eine andere, ergänzende Vermutung liegt in der Tatsache, daß Nitrat und Ammonium an verschiedenen Stellen der Pflanzen assimiliert werden: Ammonium in der Wurzel, Nitrat hauptsächlich in den Blättern (Marschner, 1995; Heldt, 1999). Daher steht bei den nitraternährten Pflanzen mit der Nitratassimilation ein zusätzlicher PS I-Elektronenakzeptor zur Verfügung. Eine Hypothese war, daß die Abnahme von Elektronen an PS I bei nitraternährten Pflanzen eine Entlastung und damit eine Schutzfunktion für die Pflanzen bei hohen Lichtintensitäten bedeutet (Vanselow, 1993).

In diesem Zusammenhang spielte auch die Mehler-Reaktion eine große Rolle, die ebenfalls einen Akzeptor für Elektronen an PS I darstellt. Bei dieser Reaktion werden jedoch Elektronen direkt auf Sauerstoff übertragen, was zur Bildung von für die Zelle schädlichen Sauerstoffradikalen führt (Asada und Takahashi, 1987; Schreiber und Neubauer, 1990; Hormann et al.; 1993). Eine Arbeitshypothese während des Projekts bestand darin, daß die ammoni-

umernährten Pflanzen statt der fehlenden Stickstoffassimilation in den Chloroplasten verstärkt die Mehler-Reaktion als Elektronenakzeptor nutzen.

Diese Vermutung wurde durch biochemische Untersuchungen der Lipidperoxidation und der Enzyme, die in die Entgiftungsreaktionen von Sauerstoffradikalen involviert sind, scheinbar gestützt. Bei ammoniumernährten Pflanzen trat eine höhere Lipidperoxidation sowie eine erhöhte Aktivität der Sauerstoffradikal-fangenden Enzyme auf (Zhu et al., 2000).

Erste Zweifel an oben skizzierten Bild ergaben sich durch die Messungen von Bendixen (1998). Er untersuchte die Schädigung von PS II, die sogenannte Photoinhibition, sowie den damit verbundenen Reparaturzyklus, der mit der Bildung von Zeaxanthin verbunden ist. Obwohl die nitraternährten Pflanzen eine deutlich höhere Zeaxanthin-Bildung zeigten und damit eine höhere Aktivität des Reparaturzyklus vermuten ließen, zeigten sich in der Photoinhibition keine stickstoffspezifischen Unterschiede.

Die Ursache für die erniedrigte Zeaxanthin-Bildung in ammoniumernährten Pflanzen fand Bendixen im Ascorbat-Mangel, der wahrscheinlich auf eine höhere Aktivität der radikalfangenden Mechanismen zurückzuführen ist. Da sich aber kein Unterschied in der Photoinhibition zeigte, müssen die ammoniumernährten Pflanzen einen anderen Weg gefunden haben, mit hohen Lichtintensitäten umzugehen. Der niedrigere Zeaxanthingehalt erwies sich also als Sekundäreffekt. Die Ursachen waren woanders als in Photosystem II zu suchen.

Diese Hypothese wurde gestützt durch die Messungen in der vorangegangenen Diplomarbeit (Schinner, 1997). Hier entstand die Vermutung, daß es bei nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen unterschiedliche Präferenzen für Elektronenakzeptoren an PS I gibt. Als Hauptakzeptor für die Abnahme von Elektronen aus der photosynthetischen Elektronentransportkette steht an erster Stelle der Calvin-Zyklus zur Assimilation von CO<sub>2</sub>. Der zweitwichtigste Elektronenakzeptor ist bereits die Stickstoffassimilation. Als weitere Akzeptoren wurden die bereits erwähnte Mehler-Reaktion, der zyklische Transport um PS I sowie der Export aus dem Chloroplasten in die anderen Kompartimente der Zelle in Betracht gezogen. Diesem Export sowie den Interaktionen der verschiedenen Kompartimente wurde in der Forschung lange keine große Bedeutung beigemessen. Es herrschte die Meinung vor, daß die Chloroplasten im Hellen "arbeiten", während die Mitochondrien im Dunkeln das für die Zelle notwendige ATP bereitstellen.

Während in der vorangegangenen Diplomarbeit ein Großteil der Akzeptoren noch in den Chloroplasten vermutet wurde, ergab sich in der vorliegenden Arbeit eine starke Verschiebung der Prozesse aus den Chloroplasten hinaus, besonders in die Mitochondrien. Damit wird diese Arbeit Teil der neuen Richtung in der Photosyntheseforschung, daß Photosynthese nicht mehr isoliert, sondern nur noch im Wechselspiel mit dem Cytosol, den Peroxisomen und den Mitochondrien betrachtet werden darf (Backhausen et al., 1994; Raghavendra et al., 1994; Gardeström und Lernmark, 1995; Krömer, 1995; Noctor und Foyer, 1998; Padmasree und Raghavendra, 1999). Dieses neue Konzept liefert, unterstützt durch die Messungen dieser Arbeit, erstmals eine Hypothese, die alle bekannten experimentellen Ergebnisse zu

---

einer Erklärung der unterschiedlichen Radikalentstehung bei nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen zusammenfassen kann.

## 2. Stoffwechselläufe der Zellkompartimente

In der vorliegenden Arbeit geht es darum, herauszufinden, warum ammoniumernährte Pflanzen Stoffwechselwege benutzen, die ein höheres Schädigungspotential als die von nitraternährten Pflanzen haben. Es wird vermutet, daß die Ursache im Wechselspiel der verschiedenen Bestandteilen einer pflanzlichen Zelle, den Zellkompartimenten, liegt. Deshalb werden in den folgenden Abschnitten die einzelnen Kompartimente und ihre Funktionen als Übersicht vorgestellt. Für die Arbeit wichtige Details werden zusammen mit den Ergebnissen besprochen.

### 2.1. Aufbau einer Pflanzenzelle

Abbildung 2.1 zeigt die schematische Darstellung einer Pflanzenzelle. Die Zelle ist von einer Zellwand und einer Plasmamembran umgeben, die auch als Plasmalemma bezeichnet wird. Im Innern enthält die Zelle verschiedene charakteristisch geformte Organellen, durch die die Zelle in verschiedene Räume (subzelluläre Kompartimente) unterteilt wird. Jeder dieser Räume ist auf bestimmte Aufgaben des Stoffwechsels spezialisiert.

Die größte Organelle ist die Vakuole, die etwa 80% des gesamten Zellvolumens einnimmt. Ihre Aufgabe ist die Aufrechterhaltung des Zellurgors. Außerdem dient sie als Speicher und "Abfalldepot".

Das nächstgrößere Kompartiment wird durch die Chloroplasten gebildet. Den Rest der Zelle teilen sich die Mitochondrien, Peroxisomen, der Zellkern, das endoplasmatische Reticulum (ER) und der Golgi-Apparat. Das Zellplasma außerhalb dieser Organellen wird als Cytosol bezeichnet.

Jede Zelle innerhalb eines pflanzlichen Gewebes oder eines Zellverbandes ist mit ihrer Nachbarzelle über Plasmodesmen verbunden (Robard und Lucas, 1990). Sie verbinden das Cytoplasma einer Zelle mit dem der benachbarten Zelle und bewerkstelligen den Stoffaustausch. Der so entstandene cytoplasmatische Verbund innerhalb einer Pflanze wird Symplast genannt und dem Apoplasten, mit dem der gesamte extrazelluläre Raum innerhalb eines pflanzlichen Gewebes umschrieben wird, gegenübergestellt. Für diese Arbeit sind be-

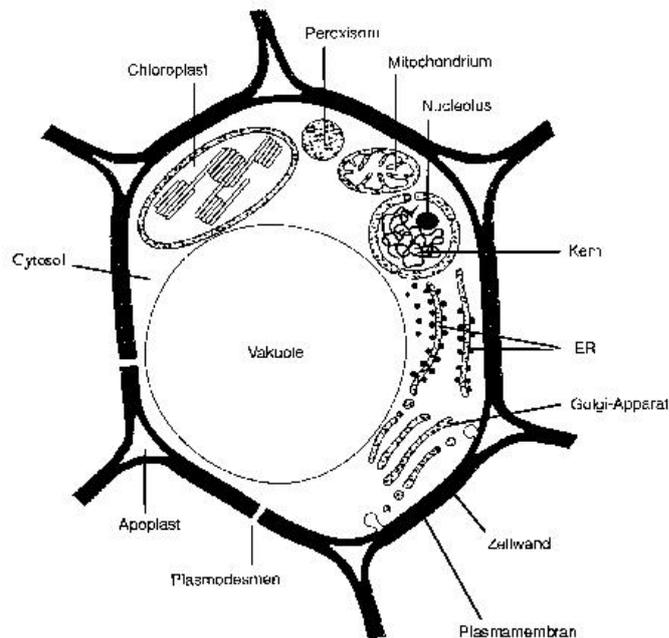


Abbildung 2.1.: Schematische Darstellung einer Pflanzenzelle (Heldt, 1999).

sonders die vier Kompartimente Chloroplasten, Mitochondrien, Peroxisomen und Cytosol von Bedeutung. Sie werden deshalb in den nächsten Abschnitten ausführlich besprochen.

## 2.2. Chloroplasten

In den Chloroplasten findet die Photosynthese statt. Die ellipsoiden Organellen mit einem Volumen von ca.  $40 \mu\text{m}^3$  sind von zwei Membranen umgeben. Im Inneren des Chloroplasten befindet sich eine Doppellipidschicht, die als Thylakoidmembran bezeichnet wird. Da sie in sich geschlossen ist, teilt sie den Chloroplasten in einen äußeren Bereich (Stroma) und einen inneren Bereich (Lumen) auf. Die Lichtreaktion der Photosynthese wird von den Enzymen der Thylakoidmembran katalysiert, die Dunkelreaktion findet im Stroma statt.

### 2.2.1. Photosysteme und Reparaturzyklus gegen Photoinhibition

Das zur Photosynthese notwendige Licht wird in den Photo- bzw. Antennensystemen PS I und PS II absorbiert.

Die Antennenpigmente werden aus Chlorophyll-Molekülen gebildet, die in der Lage sind, Licht unterschiedlicher Wellenlängen zu absorbieren. Ein Photosystem besteht aus ca. 300

Chlorophyllmolekülen a (Chl a), weiteren Photorezeptormolekülen (Chl b und Carotinoide) und einem Reaktionszentrum (RZ), in dem lichtgetriebene Ladungstrennungen stattfinden. Das Reaktionszentrummolekül ist ein spezielles Chl a, das im Falle von PS I bei  $\lambda = 700$  nm (P700), im Falle von PS II bei  $\lambda = 680$  nm (P680), sein Absorptionsmaximum hat.

Die Antennenfläche wird durch den *Light-Harvesting-Komplex* (LHC) vergrößert, der den größten Teil des Lichts absorbiert und auf die beiden Photosysteme überträgt. Der bewegliche Anteil dieses Antennenkomplexes ermöglicht eine Veränderung der relativen Antennengröße von PS I und PS II. Dadurch kann die Pflanze in Abhängigkeit von den jeweiligen Rahmenbedingungen die Energieübertragung auf die beiden Photosysteme regeln und ausgleichen.

Wird die Pflanze hohen Lichtintensitäten ausgesetzt, kommt es zu einer Inaktivierung des photosynthetischen Apparates. Diese lichtbedingte Zerstörung wird als Photoinhibition bezeichnet. Zur Zeit gehen alle Modelle davon aus, daß der Ort der Photoinhibition im Photosystem II liegt und zu einer Beeinträchtigung des Elektronentransportes führt.

Als Schutzmechanismus gegen Lichtstreß fungiert der Xanthophyllzyklus. Die zum Xanthophyllzyklus gehörenden drei Xanthophylle (Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin) können ineinander umgewandelt werden und gehören zur Gruppe der Carotinoide (siehe Kapitel 4.1.1).

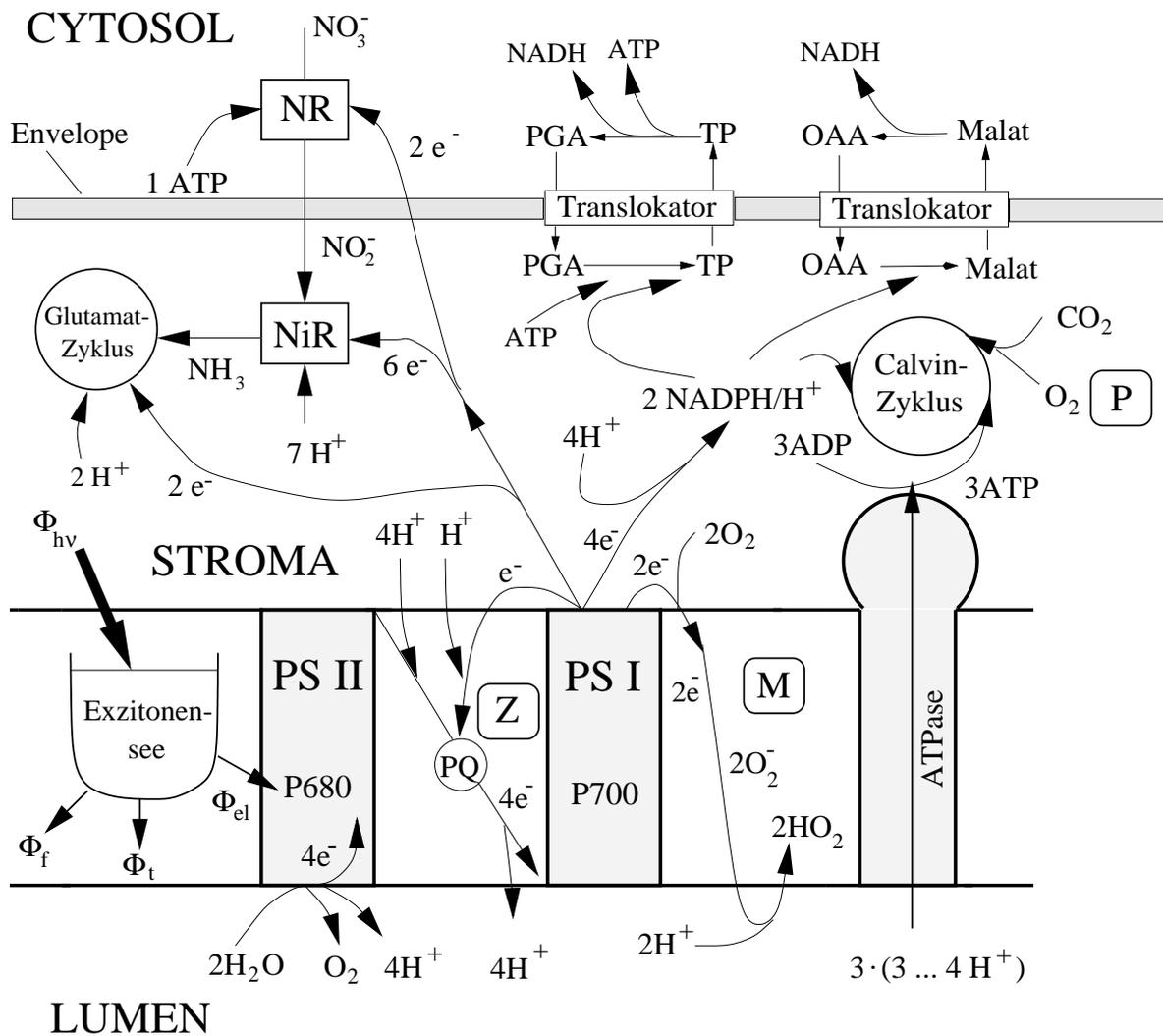
### **2.2.2. Elektronentransportkette und linearer Elektronentransport**

Die Elektronentransportkette (ETC) beginnt nach Absorption eines Photons mit der Anregung des Reaktionszentrums von PS II (Abbildung 2.2). Hier findet die Ladungstrennung statt, der Elektronenakzeptor Pheophytin wird reduziert. Das wasserspaltende Enzym (WSE) spaltet in vier Schritten zwei Moleküle  $H_2O$  aus dem Lumen in ein Molekül Sauerstoff, vier Protonen und vier Elektronen.

An der ETC sind viele Komponenten beteiligt. In einer Reihe von Redoxreaktionen werden die Elektronen von einem Reaktionspartner auf den anderen weitergegeben. Das reduzierte Pheophytin reoxidiert durch die Weitergabe des Elektrons an den primären Chinonakzeptor  $Q_A$ . Über Zwischenschritte (u.a. den Plastoquinonpool (PQ) und PS I, Abbildung 2.2) wird schließlich Ferredoxin reduziert.

Der Transport von Elektronen über die Thylakoidmembran ist mit einem Transport von Protonen über die Membran verbunden. Dies führt zum Aufbau eines pH-Gradienten. Die daraus resultierende freie Reaktionsenthalpie ermöglicht über eine inverse Protonenpumpe (ATPase, Abbildung 2.2) die Synthese von ATP aus ADP und Phosphat (Mitchell, 1977; Witt, 1979).

Beim linearen Elektronentransport gibt das Ferredoxin seine Ladung an das Enzym Ferredoxin-NADP-Reduktase ab, wodurch aus  $NADP^+$   $NADPH/H^+$  synthetisiert wird. Das  $NADPH/H^+$  wird im Calvin-Zyklus (Abbildung 2.2) als Reduktionsmittel benötigt, um



**Abbildung 2.2.:** Thylakoidmembran des Chloroplasten mit den beiden Photosystemen PS II und PS I sowie der ATPase. Außerdem dargestellt sind die verschiedenen PS I-Akzeptoren wie der Calvin-Zyklus, die Photorespiration (P), die Mehler-Reaktion (M), der zyklische Elektronentransport um PS I (Z), der Malat- und Triosephosphat (TP)-Export über die Envelope des Chloroplasten und die Stickstoffassimilation mit Glutamat-Zyklus, Nitrat (NR)- und Nitritreduktase (NiR) bei nitraternährten Pflanzen.

durch die Reduktion von  $\text{CO}_2$  unter Verbrauch von ATP Kohlenhydrate zu produzieren. Außer dem linearen Elektronentransport gibt es für die Elektronen weitere Möglichkeiten, PS I zu verlassen. Diese werden im folgenden näher vorgestellt.

### 2.2.3. Zyklischer Elektronentransport

Beim zyklischen Elektronentransport (Z in Abbildung 2.2) werden Elektronen von PS I über den Plastoquinonpool (PQ) wieder in die Elektronentransportkette gebracht (Heber et al., 1982; Katona et al., 1992). Die physiologische Bedeutung dieses Prozesses *in vivo* ist umstritten. Es kann durch den damit verbundenen Transport von Protonen ins Lumen zusätzlich ATP gebildet werden, ohne daß dabei NADPH/H<sup>+</sup> entsteht. Der zyklische Elektronentransport kann durch Antimycin A inhibiert werden, da er von einem Cytochrom vermittelt wird (Lawlor, 1990; Backhausen et al., 1994; Heber et al., 1995; Mano et al., 1995).

### 2.2.4. Pseudozyklischer Elektronentransport (Mehler-Reaktion)

Bei der Mehler-Reaktion (M in Abbildung 2.2) werden aus der Wasserspaltung stammende Elektronen unter Bildung von Radikalen auf O<sub>2</sub> übertragen (Hormann et al.; 1993). Der Prozeß besteht aus mehreren Einzelreaktionen (Asada und Takahashi, 1987; Schreiber und Neubauer, 1990), in deren Verlauf unter Beteiligung der Superoxiddismutase (SOD) Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) entsteht. Dies ist ein Zellgift, das unter Beteiligung des Enzyms Ascorbatperoxidase (APO) durch Ascorbat reduziert werden kann. Dabei wird gleichzeitig Monodehydroascorbat (MDA) gebildet (siehe auch Abbildung 4.2).

Vereinfacht kann gesagt werden, daß die Mehler-Reaktion Elektronen aus der Wasserspaltung benötigt und damit zum Aufbau des pH-Gradienten beiträgt, daß sie selbst aber kein ATP verbraucht. Stöchiometrisch gesehen wird bei dieser Reaktion die Freisetzung von O<sub>2</sub>-Molekülen im zeitlichen Mittel nicht sichtbar, da das bei der Wasserspaltung an PS II erzeugte O<sub>2</sub> von der Mehler-Reaktion wieder verbraucht wird.

### 2.2.5. Stickstoffassimilation

Stickstoff wird von höheren Pflanzen in Form von Nitrationen (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) oder Ammoniumionen (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) über die Wurzel aufgenommen. Die Proteinsyntheseprozesse verarbeiten ausschließlich NH<sub>3</sub>, was bei Nitratdüngung eine Reduktion des Nitrats notwendig macht. Für die Reduktionsprozesse verbrauchen die beiden Enzyme Nitrat (NR)- und Nitritreduktase (NiR) Elektronen und Energie aus der ETC (Abbildung 2.2). Dadurch entsteht bei Nitratdüngung ein zusätzlicher Elektronenakzeptor hinter PS I (Manzano et al., 1976; Turpin und Bruce, 1990; Vanselow, 1993).

Ammoniumgedüngte Pflanzen assimilieren den Stickstoff bereits in der Wurzel (Givan, 1979). Sie besitzen daher diesen zusätzlichen Elektronenakzeptor hinter PS I nicht.

Die Untersuchung der damit verbundenen metabolischen Unterschiede zwischen nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen ist im Rahmen eines DFG-Projektes Bestandteil dieser Arbeit.

### 2.2.6. Malat-Ventil und Triosephosphat-3-Phosphoglycerat-Shuttle

Reduktionsäquivalente von PS I können in Form von NADPH/H<sup>+</sup> nicht nur an den Calvin-Zyklus gegeben, sondern auch über die Envelope ins Cytosol exportiert werden.

NADP<sup>+</sup> und NADPH in den Chloroplasten, sowie NAD<sup>+</sup> und NADH im Cytosol können allerdings die intakte Chloroplasten-Envelope nicht passieren. Stattdessen muß ein besonderes Transportsystem, das Malat-Oxalacetat-Shuttle (Dry et al., 1987; Krömer et al., 1992; Hanning und Heldt, 1993), verwendet werden. Ein Shuttle ist ein Antiporter, der einen Stoff (Malat) gegen einen anderen (Oxalacetat, OAA) über eine Membran austauscht (Abbildung 2.2).

Chloroplasten können reduzierende Äquivalente auch durch den Triosephosphat-3-Phosphoglycerat-Shuttle (TP und PGA in Abbildung 2.2) in das Cytosol liefern. Durch diesen Shuttle wird dem Cytosol mit NADH gleichzeitig auch ATP bereitgestellt (TP-PGA-Shuttle in Abbildung 2.2).

### 2.2.7. Photorespiration

Ein weiterer Elektronenakzeptor der ETC ist die Photorespiration, in Abbildung 2.2 angedeutet als O<sub>2</sub>-Aufnahme (P) im Calvin-Zyklus. Da an der Photorespiration auch die Zellkompartimente Mitochondrium und Peroxisom beteiligt sind, wird in Abschnitt 2.4 noch einmal gesondert darauf eingegangen.

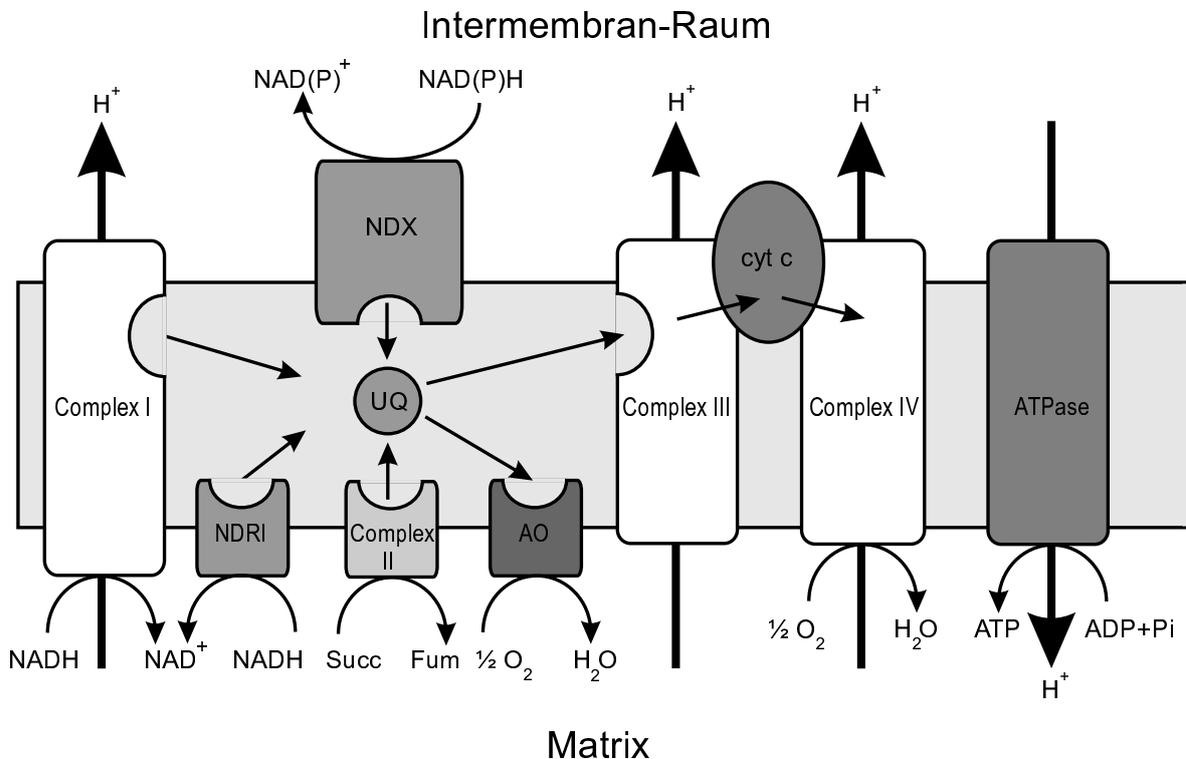
## 2.3. Mitochondrien

Mitochondrien stellen durch die aerobe Respiration die Haupt-ATP-Quelle für alle energieverbrauchenden Reaktionen im Cytosol (z.B. Wachstum) dar. Sie haben eine Größe von etwa 1x2 µm<sup>2</sup> und bestehen aus einer äußeren und einer inneren Membran, dem dazwischen liegenden Intermembran-Raum und der Matrix innerhalb der inneren Membran.

An der nicht lichtgetriebenen Respiration sind hauptsächlich vier Prozesse beteiligt: die Glycolyse, der Citratzyklus und die Prozesse des mitochondrialen Elektronentransportes sowie der ATP-Synthese, wobei die Glycolyse nicht in den Mitochondrien, sondern im Cytosol stattfindet (Siedow und Umbach, 1995). Bei der Glycolyse wird Saccharose in Pyruvat umgewandelt, welches vom Cytosol in die Mitochondrien transportiert wird, wo es vom Citratzyklus zu Kohlendioxid oxidiert wird.

Der Citratzyklus ist ein komplexer Stoffwechselweg in der Mitochondrienmatrix. Vereinfacht gesagt werden Acetyl-Reste zu Kohlendioxid oxidiert (Koolman und Röhm, 1998). Die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente dienen zur ATP-Synthese. Auf den mitochondrialen Elektronentransport und die ATP-Synthese wird im folgenden näher eingegangen, auf den Citratzyklus in den Kapiteln 10 und 11.

### 2.3.1. Elektronentransportkette und ATP-Bildung



**Abbildung 2.3.:** Innere Mitochondrien-Membran mit den Komplexen I-IV, dem Ubiquinonpool (UQ), dem Cytochrom C (cyt c), der Alternativen Oxidase (AO), der ATPase und den beiden zusätzlichen NAD(P)H-Dehydrogenasen. Die dünnen Pfeile stellen die Richtung des Elektronentransportes dar, die dicken Pfeile markieren die Orte, an denen ein Protonentransport über die Membran stattfindet. An der Alternativen Oxidase und an Komplex IV wird Sauerstoff verbraucht (Hoefnagel et al., 1998).

Abbildung 2.3 zeigt eine schematische Darstellung der inneren Membran mit den Komplexen I-IV, dem Ubiquinonpool und der Alternativen Oxidase. Ähnlich wie im Chloroplasten findet auch hier ein Elektronentransport sowie ein Protonentransport über die Membran mit gleichzeitigem Aufbau eines Protonengradienten statt.

- **Komplex I** ist eine NADH-Dehydrogenase, die das NADH oxidiert, das in der Matrix durch den Citratzyklus erzeugt wird. Die dabei entstehenden Elektronen werden auf das Ubiquinon übertragen (Siedow und Umbach, 1995).
- **Komplex II** enthält das einzige Enzym des Citratzyklus (Succinat-Dehydrogenase), das nicht frei löslich in der Matrix vorhanden ist. Dieser Komplex katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat während des Citratzyklus (Siedow und Umbach, 1995). Die hierbei entstehenden Elektronen werden wiederum auf das Ubiquinon übertragen.

- *Komplex III* oxidiert das durch die Komplexe I und II reduzierte Ubiquinon und transferiert die Elektronen zum Cytochrom C.
- *Komplex IV* oxidiert das reduzierte Cytochrom C und stellt das Ende der mitochondrialen Elektronentransportkette dar (Siedow und Umbach, 1995).

Während dieses Elektronentransportes gibt es drei Orte (die Komplexe I, III und IV), an denen Protonen über die innere Membran transportiert werden, um eine sogenannte *Proton motive force* für die ATP-Synthese aufzubauen. Die ATPase ist an sich nicht Teil der Elektronentransportkette, wird aber auch als Komplex V bezeichnet (Siedow und Umbach, 1995). Die Umwandlung von ADP und Pi zu ATP durch die F<sub>1</sub>-Einheit der ATPase findet auf der Matrixseite statt.

Die meisten Mitochondrien in Pflanzen haben zwei weitere NAD(P)H-Dehydrogenasen: eine auf der matrixzugewandten Seite, eine weitere auf der dem Intermembran-Raum zugewandten Seite (Abbildung 2.3). Die der Matrix zugewandte NAD(P)H-Dehydrogenase kann in Konkurrenz zu Komplex I treten, um das während des Citratzyklus entstandene NADH zu oxidieren. Die dem Intermembran-Raum zugewandte NAD(P)H-Dehydrogenase wird als externe NAD(P)H-Dehydrogenase bezeichnet (Moller und Lin, 1986). Sie kann sowohl NADH als auch NADPH aus dem Cytosol reoxidieren.

Beide Dehydrogenasen transferieren die Elektronen direkt an den Ubiquinon-Pool. Da diese Oxidation nicht mit einem Transport von Protonen über die Membran verbunden ist (wie in Komplex I), trägt sie nicht unmittelbar zur ATP-Bildung bei.

### 2.3.2. Alternative Oxidase

In der Elektronentransportkette der Pflanzenmitochondrien können Elektronen vom Ubiquinon-Pool anstatt auf Komplex III auch über ein Enzym auf Sauerstoff übertragen werden. Die dabei involvierte Oxidase wird Alternative Oxidase genannt (AO in Abbildung 2.3). Bei diesem Weg werden zwei Komplexe umgangen, an denen Protonen für die ATP-Bildung über die Membran transportiert werden könnten (Abbildung 2.3). Unter welchen Bedingungen und in welchem Umfang die Alternative Oxidase zum Einsatz kommt, ist noch ungeklärt. Lange wurde davon ausgegangen, daß sie als sogenanntes Überlaufventil für den Cytochrom-Weg dient, d.h. nur dann von Bedeutung ist, wenn der Ubiquinon-Pool stark reduziert ist (Lambers, 1980; Moore und Siedow, 1991). Es zeigte sich aber, daß die Alternative Oxidase bei einem erhöhten Pyruvatgehalt mit dem Hauptweg um die Elektronen vom Ubiquinon-Pool konkurrieren kann (Millar et al., 1993; Umbach et al., 1994; Hoefnagel et al., 1995; Ribas-Carbo et al., 1995; Vanlerberghe et al., 1995; Igamberdiev et al., 1997). In diesem Fall ist für ihre Aktivierung keine Sättigung des Hauptweges nötig.

### 2.3.3. Sauerstoffverbrauch

Sowohl an Komplex IV als auch an der Alternativen Oxidase wird Sauerstoff verbraucht (Abbildung 2.3). Dieser Verbrauch kann als sogenannte Dunkelatmung mit der Clark-Elektrode (Kapitel 3.3) bestimmt werden. Allerdings findet hierbei keine Unterscheidung zwischen dem Sauerstoffverbrauch an der Alternativen Oxidase und dem Sauerstoffverbrauch an Komplex IV statt.

Eine solche Unterscheidung kann mit Hilfe von Inhibitoren vorgenommen werden. So läßt sich der Cytochrom-Weg durch Antimycin A an Komplex III inhibieren (Furbank und Horton, 1987; Nicholls und Ferguson, 1992), während die Alternative Oxidase mit SHAM (Salicylhydroxamic Acid) ausgeschaltet werden kann (Siedow, 1982). Allerdings ist zu beachten, daß der nicht-inhibierte Weg die Arbeit des inhibierten Wegs manchmal mit übernimmt (Day et al., 1996).

## 2.4. Peroxisomen und ihre Rolle bei der Photorespiration

Die im Licht stattfindende Photorespiration ist eine Folge der mangelnden Selektivität der Ribulosebisphosphat-Carboxylase (Rubisco), die neben der Bindung von  $\text{CO}_2$  am RuBP auch die von  $\text{O}_2$  vermittelt. Wie bei der Zellatmung findet bei der Photorespiration unter Sauerstoffverbrauch eine Substratoxidation unter Bildung von  $\text{CO}_2$  statt. Während jedoch bei der eigentlichen Respiration in den Mitochondrien die Oxidation von Substraten zu  $\text{CO}_2$  zum Zweck der Gewinnung von ATP erfolgt, wird bei der Photorespiration ATP in erheblichem Maße verbraucht. Bei der Oxygenierung ist das Verhältnis von ATP zu NADPH ungünstiger als bei der Carboxylierung, nämlich 5:3 (im Vergleich zu 3:2 bei der Carboxylierung).

### 2.4.1. Reaktionsschritte der Photorespiration

An der Photorespiration sind die drei Zellkompartimente Chloroplast, Peroxisom und Mitochondrium beteiligt. Da die Affinität der Rubisco zu  $\text{O}_2$  und  $\text{CO}_2$  genetisch bestimmt ist, entscheidet das Verhältnis der Konzentrationen von  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  im Chloroplasten über den Anteil der Photorespiration. Unter Photorespirationsbedingungen ist die Rubisco als Oxygenase katalytisch aktiv.

Die Hauptaufgabe allerdings ist unter Mitwirkung von  $\text{CO}_2$  die Umwandlung von Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) zu 3-Phosphoglycerat. Auch bei der Oxygenierung entsteht 3-Phosphoglycerat, zusätzlich jedoch 2-Phosphoglycolat. In einem relativ aufwendigen "Recycling"-Prozeß wird aus diesem Nebenprodukt die Ausgangsverbindung Ribulose-1,5-bisphosphat zurückgewonnen:

Der Recycling-Prozeß beginnt in den Chloroplasten mit der Umwandlung von 2-Phosphoglycolat zu Glycolat (Abbildung 2.4). Über einen spezifischen Translokator wird das

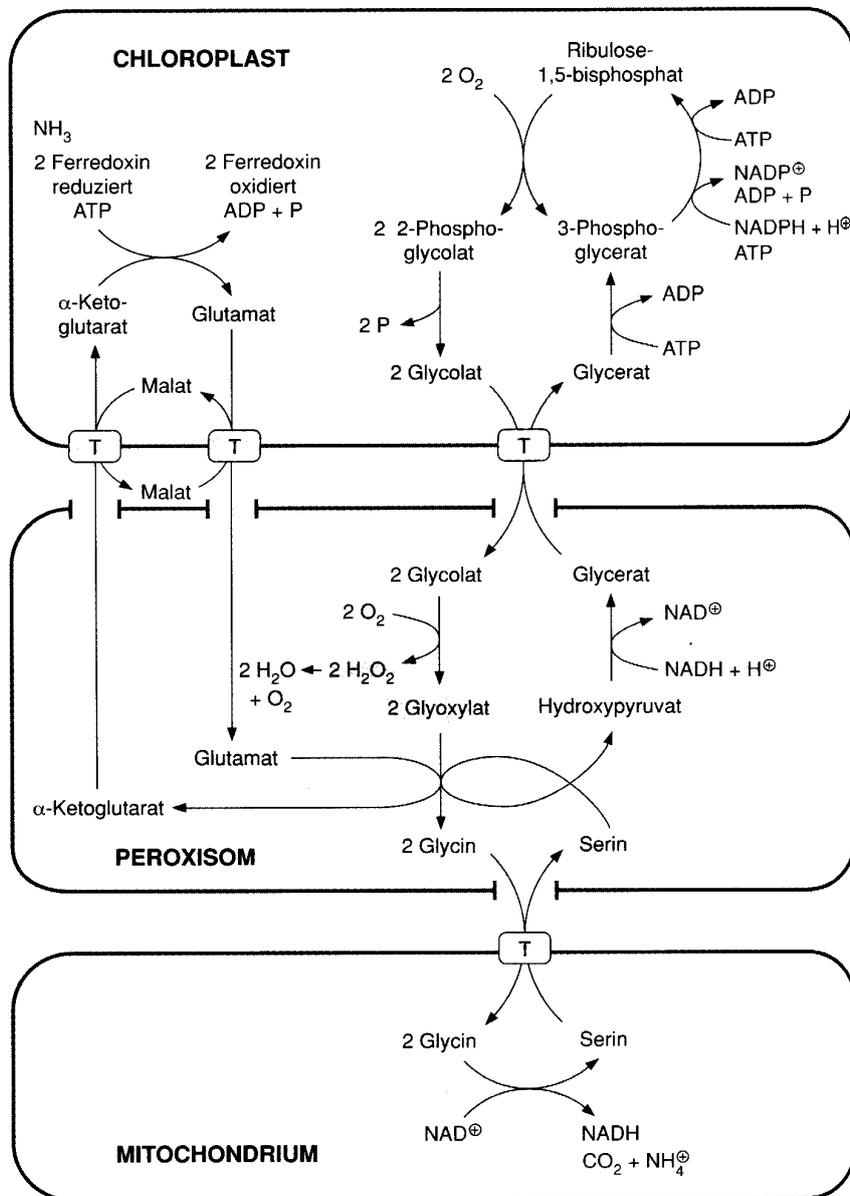


Abbildung 2.4.: Reaktionsschritte der Photorespiration und ihre Lokalisation. T = Translokator (Heldt, 1999). Weitere Erläuterungen im Text.

Glycolat aus den Chloroplasten und über Poren in die Peroxisomen geschleust. In den Peroxisomen wird das Glycolat durch verschiedene Reaktionen, bei denen u.a. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entsteht, in Glycin umgewandelt.

Das Glycin verläßt die Peroxisomen durch Poren und wird in die Mitochondrien transpor-

tiert. In den Mitochondrien erfolgt die Oxidation von zwei Molekülen Glycin zu einem Molekül Serin unter Freisetzung von  $\text{CO}_2$  und  $\text{NH}_4^+$ . Die dabei anfallenden Reduktionsäquivalente werden auf  $\text{NAD}^+$  übertragen.

Das gebildete Serin verläßt die Mitochondrien und wird in den Peroxisomen durch die in Abbildung 2.4 gezeigten Prozesse in Glycerat umgewandelt, wobei in der Schleife in Abbildung 2.4 die Transaminase die Aminogruppe auf das Glyoxylat überträgt. Das gebildete Glycerat wird aus den Peroxisomen in die Chloroplasten importiert.

Im Chloroplasten wird das Glycerat in verschiedenen Reaktionsschritten unter ATP-Verbrauch in PGA umgewandelt und in den Calvin-Zyklus eingeschleust. Damit ist die "fälschliche"  $\text{O}_2$ -Bindung wieder "korrigiert" worden.

Die Bildung von RuBP aus Ribulose-5-phosphat kann durch den Inhibitor Glyceraldehyd unterbunden werden. Glyceraldehyd inhibiert das Enzym Phosphoribulokinase, das die Umwandlung katalysiert. Da RuBP auch den Ausgangstoff des Calvin-Zyklus darstellt, wird durch Glyceraldehyd sowohl die Photorespiration als auch der Calvin-Zyklus inhibiert (Stokes und Walker, 1972; Wu et al., 1991).

#### **2.4.2. Nutzen der Photorespiration**

Es stellt sich die Frage, inwieweit der energieverbrauchende Photorespirationsweg für die Pflanze nützlich ist, da der Gewinn der Photorespiration Null ist. Es wird viel ATP und NADPH verbraucht, es entstehen aber keine neuen Stoffe.

Eine problematische Situation liegt vor, wenn die Spaltöffnungen (Stomata) bei Blättern unter vollem Licht wegen Wassermangels geschlossen sind und dadurch kein  $\text{CO}_2$  aufgenommen werden kann. In diesem Fall wird der energieverbrauchende Photorespirationsweg von der Pflanze genutzt, um das durch die Lichtreaktion bereitgestellte NADPH und ATP, das durch die Photosynthese nicht verbraucht werden kann, zu eliminieren. Die Photorespiration kann somit eine Schutzfunktion vor einer Überreduktion und Überenergetisierung des Photosyntheseapparates darstellen.

### **2.5. Austausch von Reduktionsäquivalenten**

Wie in Abschnitt 2.4 erwähnt, ist bei der in den Peroxisomen erfolgenden Reduktion des Hydroxypyruvats zu Glycerat NADH das Reduktionsmittel. Da die Peroxisomen keine Stoffwechselketten besitzen, die das NADH in den erforderlichen hohen Raten bereitstellen können, sind sie von einer Versorgung mit Reduktionsäquivalenten von außen abhängig.

Die Reduktionsäquivalente werden wohl deshalb indirekt über die Aufnahme von Malat und die Freisetzung von Oxalacetat in die Peroxisomen importiert (Abbildung 2.5, Reumann et al., 1994).

Eine Schlüsselfunktion hat dabei die Malat-Dehydrogenase (MDH in Abbildung 2.5; Musrati



während der Photosynthese für die Energieversorgung des Cytosols wichtig (Krömer und Heldt, 1991).

Tatsächlich wird normalerweise nur etwa die Hälfte des Bedarfs der Peroxisomen an Reduktionsäquivalenten aus den Mitochondrien abgezogen und der andere Teil von den Chloroplasten abgedeckt (Hanning und Heldt, 1993). So bleibt in den Mitochondrien nach der Oxidation von Glycin noch genügend NADH für die ATP-Synthese durch die Atmungskette.

Dieser Austausch von Reduktionsäquivalenten zeigt, wie stark die Stoffwechselprozesse der unterschiedlichen Kompartimente miteinander verbunden sind. Limitierungen oder Streßerscheinungen in einem Kompartiment werden sich immer auch auf die anderen Kompartimente auswirken.

## 2.6. Zusammenfassende Darstellung der Stoffwechselprozesse in C<sub>3</sub>-Pflanzen

In Abbildung 2.6 sind noch einmal zusammenfassend die in den vorangegangenen Abschnitten besprochenen Stoffwechselprozesse dargestellt. Wichtig zu erwähnen ist hierbei, daß es sich um die Stoffwechselprozesse in C<sub>3</sub>-Pflanzen handelt. Zu den C<sub>3</sub>-Pflanzen gehört z.B. die Buschbohne (*Phaseolus vulgaris* L.). Der Name resultiert daraus, daß das erste CO<sub>2</sub>-Fixierungsprodukt (3-Phosphoglycerat) ein 3-Kohlenstoffkörper ist.

Abbildung 2.6 zeigt die Kompartimente Chloroplast (unten), Mitochondrion (oben), Peroxisom (Mitte links) und Cytosol (Mitte). Durchgezogene Linien mit Pfeilen kennzeichnen chemische Umwandlungen, gestrichelte Linien mit Pfeilen deuten die Translokation zwischen den Kompartimenten an. Endprodukte sind mit eingerahmten Großbuchstaben gekennzeichnet.

Unten rechts ist die bereits in Abbildung 2.2 genauer dargestellte photosynthetische Elektronentransportkette mit den beiden Photosystemen PS II und PS I abgebildet. Zusätzlich sind unten rechts die ebenfalls bereits in Abbildung 2.2 gezeigte Nitrat- und Nitritreduktase mit dem GS/GOGAT-System sowie der Malat-OAA-Shuttle zu sehen.

Unten links ist der Calvin-Zyklus mit Carboxylierung und Oxygenierung schematisch angedeutet. Ausgehend von der Oxygenierung ist im linken Teil von Abbildung 2.6 der bereits aus Abbildung 2.4 bekannte Weg der Photorespiration gezeigt, der die drei Kompartimente Chloroplast, Peroxisom und Mitochondrion umfaßt. Das bei der Photorespiration in den Mitochondrien entstandene NH<sub>3</sub> wird durch das GS/GOGAT-System refixiert. Dieser Prozeß ist in Abbildung 2.6 nicht dargestellt.

In der Mitte von Abbildung 2.6 (oben) ist der Citratzyklus skizziert (genauere Darstellung in Abbildung 10.4). Zu sehen sind die beiden Ausgangsprodukte Pyruvat und OAA aus dem Cytosol, die nach Freisetzung von CO<sub>2</sub> in Citrat und  $\alpha$ -Ketoglutarat (in dieser Abbil-

2-OG) umgewandelt werden. Es kann sowohl Citrat als auch  $\alpha$ -Ketoglutarat (2-OG) aus den Mitochondrien exportiert werden, die Umwandlung von Citrat kann auch im Cytosol erfolgen.  $\alpha$ -Ketoglutarat (2-OG) wird für die Nitratassimilation im GS/GOGAT-System in den Chloroplasten benötigt. Auch durch diesen Stoffwechselprozeß (Citratzyklus, Nitratassimilation) stehen drei Kompartimente (Chloroplast, Cytosol und Mitochondrion) in engem Zusammenhang. Dies wird dadurch verstärkt, daß für die Bildung von Pyruvat und OAA (die beiden Ausgangsstoffe des Citratzyklus) Triosephosphat (TP in Abbildung 2.6) benötigt wird. TP entsteht in den Chloroplasten im Calvin-Zyklus und wird durch den in Abbildung 2.2 gezeigten Triosephosphat-3-Phosphoglycerat-Shuttle aus den Chloroplasten exportiert.

Oben rechts in Abbildung 2.6 ist die mitochondriale Elektronentransportkette mit den Komplexen I-IV, dem Ubiquinonpool und der Alternativen Oxidase (AO) dargestellt (siehe auch Abbildung 2.3). Durch die externe NAD(P)H-Dehydrogenase kann NAD(P)H aus dem Cytosol reoxidiert werden.

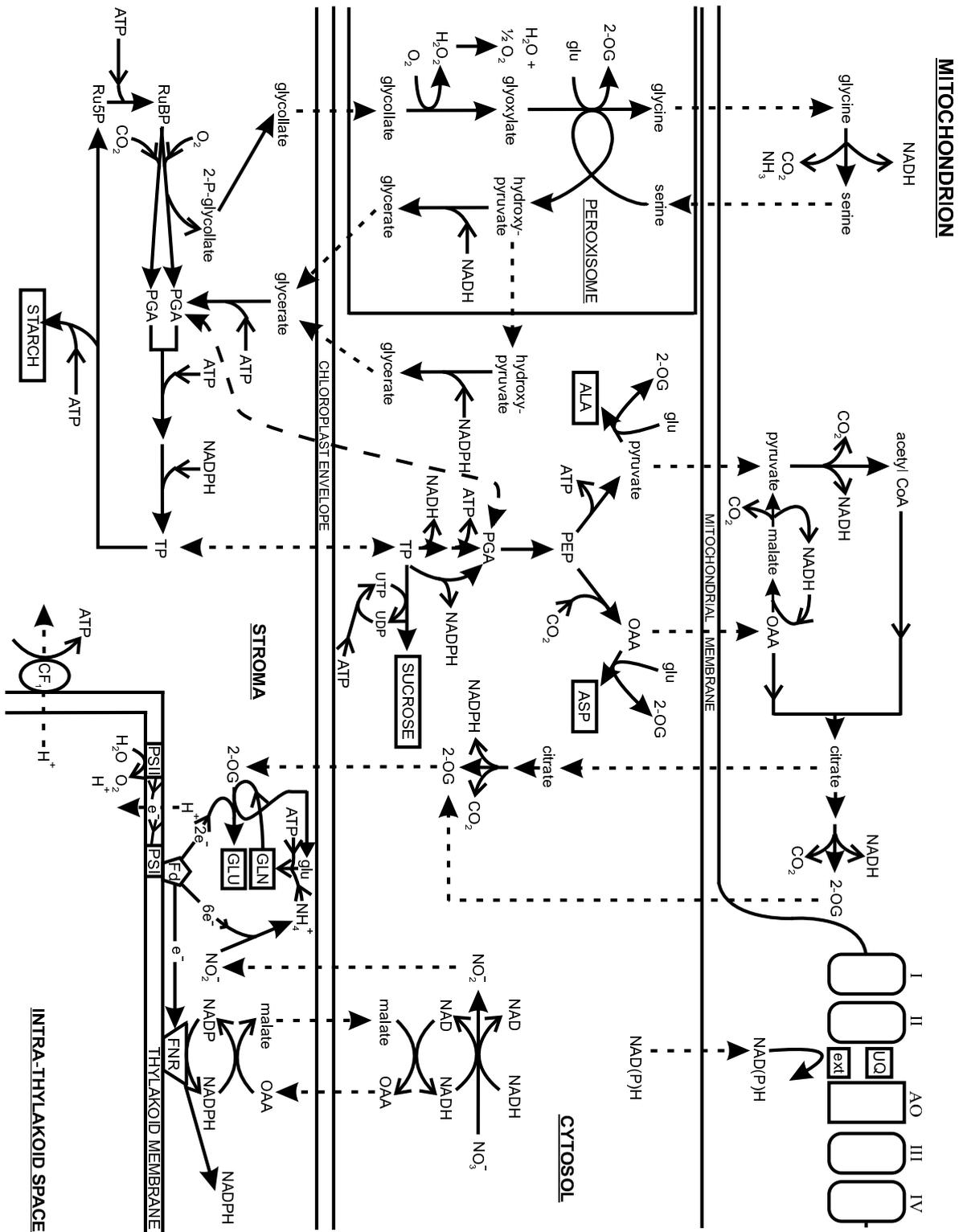


Abbildung 2.6.: Zusammenfassende Darstellung der Stoffwechselprozesse in den Zellkompartimenten Chloroplast, Mitochondrium, Peroxisom und Cytosol in  $C_3$ -Pflanzen (nach Noctor und Foyer, 1998). Zusätzlich eingezeichnet ist der PGA-Austausch über die Chloroplasten-Membran und die Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran. Genauere Erläuterungen im Text.

## 3. Material und Meßsysteme

Im folgenden Abschnitt werden die Pflanzen und Meßmethoden näher vorgestellt, mit denen die im vorherigen Kapitel dargestellten metabolischen Prozesse untersucht wurden.

### 3.1. Verwendete Pflanzen

#### 3.1.1. Buschbohne (*Phaseolus vulgaris* L.)

Für die meisten der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde die C<sub>3</sub>-Pflanze Buschbohne verwendet.

Ihre Anzucht erfolgte in einem beheizbaren Gewächshaus des Instituts für Pflanzenernährung und Bodenkunde der Universität Kiel. Schwankungen der Tageslichtintensität wurden nicht kompensiert. Für die Pflanzenanzucht unter verschiedenen Lichtintensitäten ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  für "Schwachlicht"-Bedingungen,  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  für "Normallicht"-Bedingungen und  $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  für "Starklicht"-Bedingungen) wurde jedoch eine zusätzliche Beleuchtung installiert (Natriumdampf lampen, Philips SON-T AGRO 400 W).

Die Samen quollen für 10 Stunden in CaSO<sub>4</sub>-Lösung. Nach dem Keimen auf mit CaSO<sub>4</sub>-Lösung getränktem Filterpapier wurden die Keimlinge für fünf Tage in CaSO<sub>4</sub>-Lösung gestellt. Danach wurden die Wurzeln der Bohnenpflanzen mit Schaumstoff umwickelt und jeweils vier Pflanzen in einen 5l Eimer mit Nitratlösung (s.u.) gesetzt.

Nach weiteren sieben Tagen wurde mit der unterschiedlichen Stickstoff-Ernährung begonnen, indem die Pflanzen mit einer Nährlösung versorgt wurden, die als einzige Stickstoffquelle entweder Nitrat oder Ammonium enthielt. Die Zusammensetzung der Nährlösung war wie folgt: 5.0 mM N als (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1.6 mM K als K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 mM P als KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM Mg als MgSO<sub>4</sub>, 45  $\mu\text{mol}$  Fe als Fe-EDTA, 1  $\mu\text{mol}$  Mn als MnSO<sub>4</sub>, 1  $\mu\text{mol}$  Zn als ZnSO<sub>4</sub>, 0.1  $\mu\text{mol}$  Cu als CuSO<sub>4</sub>, 10  $\mu\text{mol}$  B als H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.01  $\mu\text{mol}$  Mo als (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>. Bei der Ammoniumnährlösung wurde Ca<sup>2+</sup> in Form von CaSO<sub>4</sub> (2.5 mM) zugegeben. Der pH-Wert der Lösungen wurde mit Hilfe einer pH-Stat-Anlage konstant auf 6.5 gehalten. Um die Nährlösungen mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen, wurde über Aquarium-Pumpen fortlaufend Luft in die Behälter gepumpt. Der Wechsel der Nährlösungen erfolgte alle 3-4 Tage.

Zur Untersuchung, wie sich eine Anzucht unter erhöhtem CO<sub>2</sub>-Gehalt bei Starklichtbe-

dingungen auf den Metabolismus von nitrat- und ammoniumernährten Buschbohnen auswirkt, wurden die Pflanzen in einer abgeschlossenen Kammer im Gewächshaus angezogen. Der erhöhte CO<sub>2</sub>-Gehalt in der Kammer betrug 500 ppm, die eingestrahlte Lichtintensität 800 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Die Temperatur in der Kammer war trotz Kühlsystem etwas erhöht und bewegte sich zwischen 22 und 25 ° Celsius.

Für die Split-Root-Messungen (Kapitel 5) wurde bei den Keimlingen, die sich vorher für fünf Tage in der CaSO<sub>4</sub>-Lösung befanden, die Pfahlwurzel entfernt. Die verbleibenden Wurzeln wurden in zwei gleiche Teile geteilt und in zwei nebeneinanderstehende Behälter von jeweils 0.4 l Volumen gesetzt. In den folgenden zwei Tagen wurden beide Behälter mit Nitratnährlösung gefüllt. Danach wurden entweder beide Gefäße mit Nitrat(NN)- oder Ammonium(AA)-Nährlösung, eine Seite mit Nitrat- und die andere mit Ammoniumnährlösung (NA) oder jeweils eine Seite mit Nitrat- oder Ammoniumnährlösung und die andere Seite mit stickstofffreier Nährlösung (N0 oder A0) gefüllt. Die Nährlösungen wurden jeden Morgen erneuert.

### 3.1.2. Mais (*Zea mays* L., Sorte Helix)

Für die Vergleichsmessungen mit C<sub>4</sub>-Pflanzen (Kapitel 9.7) wurde Mais der Sorte Helix verwendet.

Die Samen quollen für sechs Stunden in CaSO<sub>4</sub>-Lösung, bevor sie auf mit CaSO<sub>4</sub>-Lösung befeuchtetes Filterpapier gelegt wurden. Nach vier Tagen wurden die Keimlinge mit den Wurzeln für eine Woche in belüftetes Leitungswasser gestellt. Danach wurden die Wurzeln der Maispflanzen mit Schaumstoff umwickelt und jeweils vier Pflanzen in einem 5 l Eimer mit Nährlösung (0.5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.7 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 mM KCl, 2 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 nM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 1 μM Fe-EDTA) unter Tageslichtbedingungen in einem Gewächshaus des Instituts für Pflanzenernährung und Bodenkunde angezogen. Die Nährlösung wurde zweimal pro Woche gewechselt.

## 3.2. Fluoreszenzmessungen

Die Fluoreszenz aus dem Antennensystem von PS II ist die am häufigsten verwendete Meßgröße in der Photosyntheseforschung (Schreiber et al., 1986; Schreiber und Bilger, 1993). Dieses Fluoreszenzlicht entsteht stets bei der Beleuchtung von photosynthetisch aktiven Organismen. Aus seiner Emission können Rückschlüsse auf den energetischen und physiologischen Zustand der Chlorophylle gezogen werden.

### 3.2.1. Fluoreszenzentstehung

Wie in Abschnitt 2.2.1 bereits erwähnt, bestehen die Antennen der Photosysteme hauptsächlich aus den Pigmentmolekülen Chl a und Chl b. Das Absorptionsspektrum von Chl a besitzt

zwei ausgeprägte Maxima im blauen (450 nm) und roten (680 nm) Spektralbereich. Diese entstehen beim Übergang vom Grundzustand  $S_0$  zu höheren Singulettzuständen  $S_x$ . Höhere Anregungszustände können strahlungslos in den  $S_1$ -Zustand übergehen oder durch einen Energietransfer auf Nachbarmoleküle deaktivieren. Die Emission von Fluoreszenzlicht und die Energieabgabe an das Reaktionszentrum ist nur beim Übergang vom  $S_1$ -Zustand in den Grundzustand  $S_0$  möglich.

Insgesamt gibt es folgende Möglichkeiten, wie aus dem  $S_1$ -Zustand der Grundzustand  $S_0$  erreicht werden kann (Abbildung 3.1):

- durch Fluoreszenz über die Abstrahlung eines einzelnen Lichtquants,
- über die thermische Deaktivierung durch Abgabe der Energie als Wärme,
- durch Übertragung der Anregungsenergie auf ein benachbartes Pigmentmolekül oder auf das Reaktionszentrum des Photosystems,
- indirekt als Phosphoreszenz über einen Triplettzustand.

Phosphoreszenz tritt sehr selten auf und ist unter normalen physiologischen Bedingungen kaum nachweisbar.

Die beiden Photosysteme I und II unterscheiden sich sowohl in ihrem Absorptions-, als auch in ihrem Fluoreszenzmaximum. Die Absorption von PS I ist maximal bei 700 nm, die von PS II bei 680 nm. Diese Tatsache wird bei Messungen mit fernrotem Licht ( $\lambda > 700$  nm) ausgenutzt. Da damit hauptsächlich PS I angeregt wird, kann dessen Einfluß auf den jeweiligen physiologischen Prozeß abgeschätzt werden.

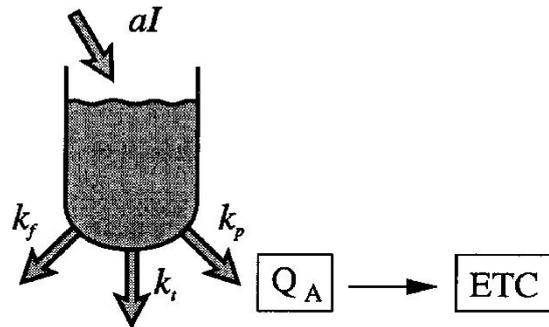
Das Intensitätsmaximum der Fluoreszenz liegt für PS I bei 735 nm, für PS II bei 683 nm. Bei Zimmertemperatur kann davon ausgegangen werden, daß die variable Fluoreszenz ausschließlich von PS II stammt (Baker und Webber, 1987).

### 3.2.2. Quenchingmechanismen

Alle Mechanismen, die zu einer Verringerung der  $S_1$ -Zustände und der dazu proportionalen Fluoreszenz führen, werden Quenchingmechanismen genannt. Dabei wird zwischen photochemischem ( $q_p$ ) und nichtphotochemischem Quenching ( $q_N$ ) unterschieden. Photochemische Quenching-Mechanismen vermindern die Fluoreszenz durch einen Abfluß der Exzitonen in die photosynthetische Elektronentransportkette (ETC). Nichtphotochemisches Quenching faßt alle Mechanismen zusammen, die nicht mit der photochemischen Nutzung durch die ETC zusammenhängen.

Das Topfmodell veranschaulicht den Sachverhalt. Man stellt sich dabei einen "Exzitonenensee" (Abbildung 3.1) vor, dessen Höhe vom Gleichgewicht zwischen eingestrahelter Lichtenergie und Exzitonenflüssen aus der Antenne bestimmt wird. Das Becken stellt die Gesamtheit

der Photosysteme II dar. Der Abbau der Exzitonenergie kann über thermische und photochemische Deaktivierung sowie über die Abstrahlung durch Fluoreszenz erfolgen. Diese Vorgänge werden durch die Ratenkonstanten  $k_t$ ,  $k_p$  und  $k_f$  repräsentiert (Abbildung 3.1). Unter der Annahme, daß die Ratenkonstante der Fluoreszenz  $k_f$  konstant ist, spiegelt



**Abbildung 3.1.:** Das Topfmodell. Durch eingestrahktes Licht der Intensität  $I$  bildet sich in den PS II- Antennen ein "Exzitonensee". Die Deaktivierung der Exzitonenergie kann thermisch ( $k_t$ ), photochemisch ( $k_p$ ) und über die Abstrahlung von Fluoreszenz ( $k_f$ ) erfolgen.  $a$ : Absorptionsquerschnitt der Photosysteme II.

die Intensität der Fluoreszenz den Pegelstand im Exzitonensee wider.

Der Austausch der Anregungsenergie zwischen den Photosystemen wird mit der Ratenkonstanten  $p$  beschrieben. Für diesen Energieaustausch gibt es zwei Spezialfälle: das *Separate-Unit-Modell* ( $p=0$ ), bei dem kein Anregungsenergietransfer stattfindet, und das *Matrixmodell* ( $p \rightarrow \infty$ ), das von einem sehr schnellen Anregungsenergietransfer ausgeht (Karukstis, 1992; Dau, 1994).

### 3.2.3. Yieldmessung

Bei der Fluoreszenzmessung handelt es sich um eine sogenannte Yieldmessung. Hierbei wird zwischen zwei Lichtarten unterschieden:

- Das aktinische Licht (AL) verändert den Zustand des Blattes, d. h. die Größen  $k_t$  und  $k_p$  aus Abbildung 3.1.
- Das modulierte Meßlicht (ML) detektiert den vom aktinischen Licht eingestellten Zustand.

Der differentielle Fluoreszenzyield  $y = dF/dI$  ( $F$ : Fluoreszenzsignal;  $I$ : Intensität des Lichts) stellt die Antwort  $dF$  auf eine hochfrequente Änderung  $dI$  des Meßlichts dar. Hierbei werden die Werte von  $Q_A$  und  $k_t$  am Arbeitspunkt genommen. Diesen Arbeitspunkt stellt das

aktinische Licht ein, das aus dem Licht der Aktin-Lichtquelle und dem Mittelwert des Meßlichtes besteht.

Die photosynthetischen Parameter werden durch das niederfrequente aktinische Licht verändert, das Meßlicht besitzt aber ebenfalls eine aktinische Wirkung. Die Yieldmessung detektiert jedoch nur Prozesse, die langsamer als eine Meßlichtperiode ablaufen, so daß das Meßlicht wie ein Gleichlichtanteil des aktinischen Lichtes wirkt.

### **3.2.4. Methoden der Fluoreszenzmessung**

In der vorliegenden Arbeit werden zwei unterschiedliche Methoden der Fluoreszenzmessung angewendet, die beide auf einer Bestimmung des Fluoreszenzyields beruhen. Bei der einen Methode, die mit dem Puls-Amplituden-Modulierten Fluorometer (PAM, Firma Walz, Effeltrich) durchgeführt wird, wird die Intensität des Meßlichtes konstant gehalten und der variable Fluoreszenzyield und damit die Höhe des Exzitonensees (Abbildung 3.1) gemessen (Schreiber, 1986).

Bei dem in Kiel entwickelten Verfahren (Anhang A), dem sogenannten Fluoreszenz-Clamp(FC)-Verfahren (Giannikos, 1995; Schinner, 1997; Schinner et al., 2000), wird mit Hilfe eines Regelkreises der Fluoreszenzyield und damit der Exzitonensee (Abbildung 3.1) konstant gehalten und die dafür benötigte variable Meßlichtintensität als Ausgangssignal gemessen.

Vor- und Nachteile der beiden Methoden werden in den folgenden Abschnitten und im Anhang A näher diskutiert.

#### **3.2.4.1. Puls-Amplituden-Moduliertes Fluorometer (PAM)**

Das PAM geht auf eine Entwicklung von Schreiber et al. (1986) zurück und hat sich seitdem zu einem internationalen Standardgerät entwickelt. Wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt, benutzt das Gerät für die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz aktinisches Licht und Meßlicht.

Das gepulste Meßlicht kommt über einen Lichtleiterarm (Schölly Spezial) aus einer LED (650 nm Peakwellenlänge) auf das Blatt. Durch die Verwendung von Lichtimpulsen mit einer Dauer von  $1\mu\text{s}$  bei einer Frequenz von 1.6 kHz ergibt sich eine sehr geringe, gemittelte Lichtintensität des Meßlichts. Die Meßlichtintensität kann in 12 Stufen bis zu  $320\text{ nmol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  eingestellt werden. Eine niedrige Intensität des Meßlichts ist notwendig, um die Voraussetzungen zur Messung der Grundfluoreszenz (Abschnitt 3.2.4.3) zu erfüllen. Das Licht einer Halogenlampe (Osram, HLX 64653, 24 V, 250 W, zusammen mit einem Wärmefilter und einem DT Cyan Filter), das je nach Stärke als sättigender Blitz (Abschnitt 3.2.4.3) oder als aktinisches Licht wirkt, wird ebenfalls über einen Lichtleiterarm auf das Blatt geführt. Die vom Blatt zurückgestrahlte Fluoreszenz wird über den Lichtleiter zum Detektor geleitet. Vor dem Detektor befindet sich ein Kantenfilter (RG9 1 mm), das als Langpaß Licht

im Wellenlängenbereich unter 700 nm sperrt. Dies ermöglicht die Trennung des Fluoreszenzlichts vom Meßlicht.

Ein Korrelator trennt dann aus dem Fluoreszenzlicht das Yield-Signal ab. Ein angeschlossener Rechner steuert das aktinische Licht und nimmt die Meßdaten vom PAM auf.

#### 3.2.4.2. FC-Maschine

Bei den Messungen mit dem PAM wird indirekt über Veränderungen in der Fluoreszenz auf Veränderungen der photochemischen und nichtphotochemischen Prozesse geschlossen. Mit der FC-Maschine hingegen ist es möglich, direkt die Flüsse aus den PS II-Antennen zu messen (Schinner et al., 2000).

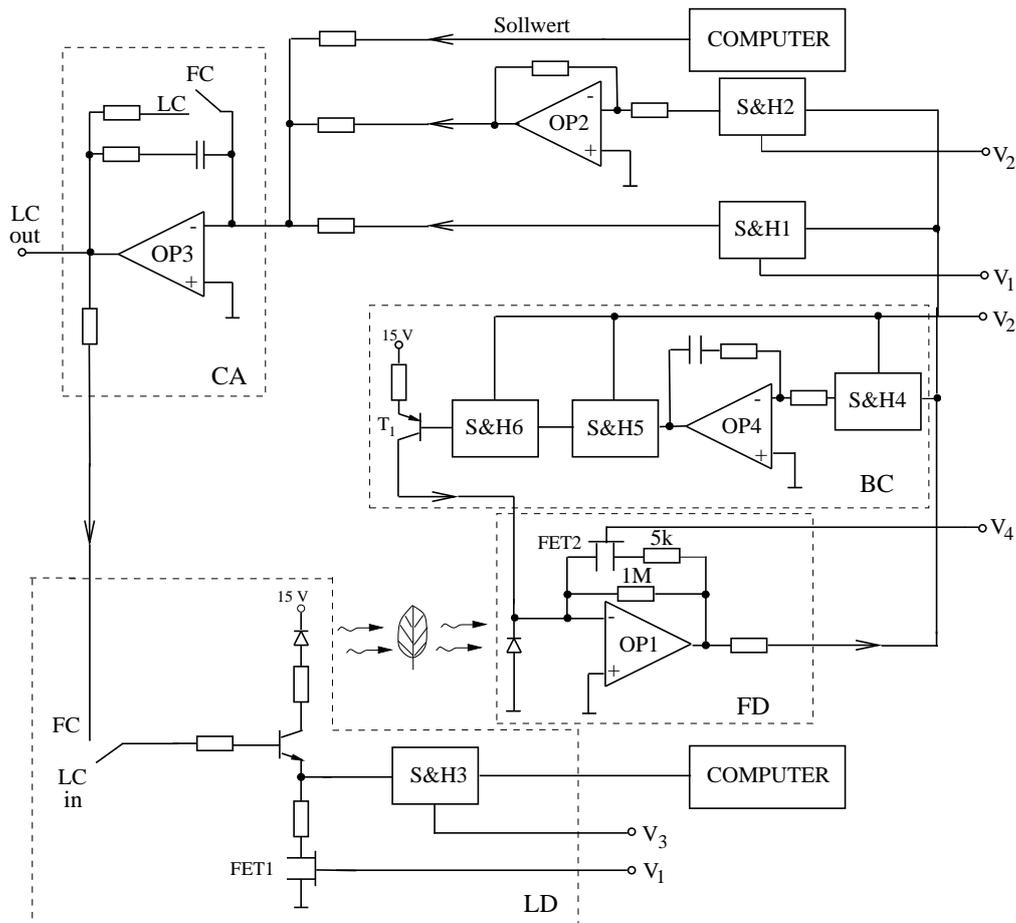
Dies wird durch einen Regelkreis möglich, der die Intensität der Meßlicht-LEDs so einstellt, daß die modulierte Chlorophyll-Fluoreszenz konstant bleibt. Die Intensität bzw. der Strom durch die LEDs dient als Maß für die Flüsse aus den PS II-Antennen.

Das Verfahren ist bei Schinner et al. (2000) beschrieben und sei deshalb hier nur in groben Zügen skizziert. Abbildung 3.2 zeigt das schematische Schaltbild der FC-Maschine. Sie besteht im Großen und Ganzen aus zwei Regelkreisen. Der Regelkreis bestehend aus OP 1, OP 3 und der LED stellt den FC-Regelkreis dar. Der andere Regelkreis bestehend aus OP 1, OP 4 und dem Transistor T 1 dient zur Unterdrückung des Hintergrundlichts.

Die FC-Regelung wird nur auf die Antwort der Fluoreszenz auf das Meßlicht angewendet (mit einer Wiederholungsrate von 5 ms; Signal  $V_1$  in Abbildung 3.3). Wie beim PAM soll ein direkter Einfluß des aktinischen Lichts auf die Antwort auf das Meßlicht vermieden werden, da dies zu einer Fehlinterpretation der Prozesse im Blatt führen würde. Aus diesem Grund wird in der Dunkelphase des Meßlichts die Hintergrundlicht-Regelung aktiviert. Das Umschalten von einem Mode in den anderen geschieht mit Hilfe von S&H-Bausteinen, die durch die in Abbildung 3.3 dargestellten Signale gesteuert werden.

**Der FC-Regelkreis** startet mit der Fluoreszenz-Messung durch den Fluoreszenz-Detektor (OP1 in Abbildung 3.2), vor dem wie beim PAM ein RG9-Filter zur Trennung von Meßlicht und Fluoreszenzlicht sitzt. Am Ausgang des Detektors ergibt sich eine Spannung zwischen 30 und 200 mV. Dieser Wert wird mit der vorher festgelegten Sollwert-Spannung verglichen. Die Differenz wird durch OP 3 verstärkt und dazu benutzt, die Intensität der LED (660 nm, Oshino, OL-SUR 14180-T) zu regeln. Wenn die Ringverstärkung groß genug ist, wird die Intensität der LED so eingestellt, daß die Differenz zwischen Sollwert-Spannung und Fluoreszenz-Signal Null wird. Die Amplitude des Stroms, der die LED regelt, wird als Maß für die Intensität des Meßlichts und damit für die Flüsse aus den PS II-Antennen benutzt. Der zeitliche Verlauf des Stroms wird mit Hilfe eines Meßrechners aufgezeichnet.

**Der Light-Clamp(LC)-Mode:** Mit der FC-Maschine können auch Messungen wie mit dem PAM (konstante Meßlicht-Intensität, variable Fluoreszenz) durchgeführt werden. Diese Möglichkeit wurde in Analogie zu Fluorescence-Clamp "Light-Clamp" genannt. Dazu wird



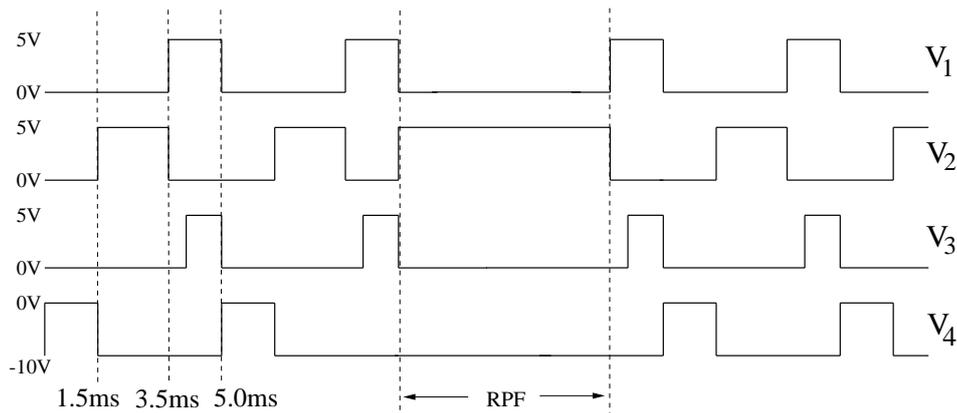
**Abbildung 3.2.:** Schematisches Schaltbild der FC-Maschine. Die gestrichelten Linien markieren die folgenden Einheiten: BC: Hintergrundlicht-Regelung; CA: Verstärkereinheit für den FC-Regelkreis; LD: Ansteuerung der Meßlicht-LEDs; FD: Fluoreszenz-Detektor. OP2 + S&H2 bewirken eine zusätzliche Hintergrundlichtunterdrückung. Der Schalter FC/LC dient zum Umschalten vom FC- in den LC-Mode (siehe Text). LC in: Spannung, um die LED im LC-Mode anzusteuern.  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_3$ ,  $V_4$ : Kontrollspannungen, deren zeitlicher Verlauf in Abbildung 3.3 dargestellt ist. S&H: Sample and Hold-Baustein, OP: Operationsverstärker.

der Regelkreis beim Schalter "FC/LC" (Abbildung 3.2) geöffnet. Um eine Meßlichtintensität von  $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  zu erhalten, wird bei "LC in" (Abbildung 3.2) eine Spannung von ungefähr 1.5V angelegt. Die Spannung, die der variablen Fluoreszenz entspricht, wird am Punkt "LC out" abgegriffen und mit dem Meßrechner aufgezeichnet.

**Die Hintergrundlicht-Regelung** wird mit Hilfe eines Regelkreises durchgeführt, der dem FC-Regelkreis sehr ähnlich ist, mit der Ausnahme, daß am Ende keine LED angesteuert wird. Stattdessen injiziert der Transistor T1 einen Strom in den Detektoreingang, der den Strom der Photodiode während der Dunkelphase des Meßlichts kompensiert. Die Stärke dieses Stroms wird während der Dunkelphase des Meßlichts ermittelt (wenn das Signal  $V_2$

(Abbildung 3.3) 5 V annimmt) und während der Lichtphase in den S&H-Bausteinen 4–6 gespeichert.

Eine zusätzliche Hintergrundlicht-Unterdrückung wird durch S&H2 und OP2 im FC-Regelkreis bereitgestellt. Die Ausgangsspannung von OP1 in der Dunkelphase des Meßlichts (die durch die Hintergrundlicht-Regelung eigentlich Null sein sollte, aber davon abweichen kann, wenn das Licht zu hell ist) wird im S&H-Baustein 2 gespeichert und in der Hellphase des Meßlichts vom Ausgangssignal von OP1 abgezogen.



**Abbildung 3.3.:** Zeitlicher Verlauf der Kontrollspannungen für die FC-Maschine.  $V_1$ : Signal, um die FC-Regelung zu aktivieren;  $V_2$ : Signal, um die Hintergrundlicht-Regelung zu aktivieren;  $V_3$ : Signal für die Datenaufnahme im Rechner;  $V_4$ : Signal für FET2, um die Verstärkung von OP1 während Fernrot-Lichtbeleuchtung zu vermindern. RPF: An- bzw. Ausschaltphase des Sättigungsblitzes.

Der Meßaufbau beinhaltet die Möglichkeit, Fernrot-Licht ( $\lambda > 700 \text{ nm}$ ) als aktinisches Licht zu verwenden. Da dieses Licht das RG9-Filter vor der Photodiode nahezu ungeschwächt passiert und dadurch den Detektor übersteuert, ist der erste Teil der Dunkelphase für die Fernrot-Licht-Messung reserviert. Durch das Steuersignal  $V_4$  (Abbildung 3.3) wird die Verstärkung von OP1 vermindert, indem zum normalen  $1 \text{ M}\Omega$ -Widerstand ein  $5 \text{ k}\Omega$ -Widerstand parallel geschaltet wird.

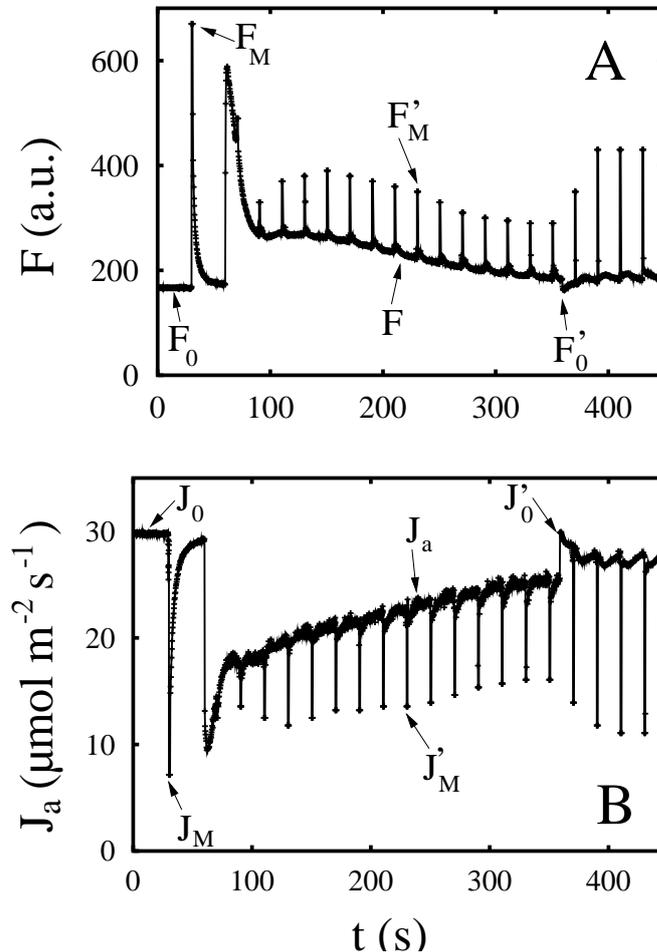
Weiteres aktinisches Licht wird durch 6–18 LEDs (660 nm, Oshino, OL-SUR 14180-T) und eine Halogenlampe (Osram, HLX 64653, 24 V, 250 W, zusammen mit einem Wärmefilter und einem DT Cyan Filter) bereitgestellt.

### 3.2.4.3. Sättigungsblitzmethode nach Schreiber

Als standardisiertes Lichtprotokoll zur Messung charakteristischer Fluoreszenzgrößen gilt die sogenannte Sättigungsblitzmethode nach Schreiber (Schreiber et al., 1986), die ursprünglich für das von Schreiber entwickelte PAM-Gerät erdacht wurde. Der Ablauf des Lichtprogramms wurde aber in gleicher Form für die FC-Messungen verwendet. In

Abbildung 3.4 sind Beispielkurven dargestellt, die mit der FC-Maschine im LC-Mode (Abbildung A, PAM-ähnlich) und im FC-Mode (Abbildung B) aufgenommen wurden.

1. Zur Messung der Grundfluoreszenz  $F_0$  bzw. des maximalen Exzitonenflusses  $J_0$  muß das



**Abbildung 3.4.:** Typischer Kurvenverlauf einer LC-Messung (A, ähnlich zur PAM-Messung) bzw. FC-Messung (B). Das Fluoreszenzsignal  $F$  ist in relativen Einheiten (a.u.) dargestellt, das FC-Signal  $J_a$  durch die Intensität der Regel-LED. Es wurde das folgende Lichtprotokoll verwendet: Die ersten 30 s ausschließlich Meßlicht zur Bestimmung der minimalen Fluoreszenz  $F_0$  bzw. des maximalen Exzitonenflusses  $J_0$ . Bei 30 s Zuschalten eines Sättigungsblitzes (0.7 s,  $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenz  $F_M$  bzw. des minimalen Exzitonenflusses  $J_M$ . Bei 60 s Einschalten des aktinischen Lichts von  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  zum Auslösen der Induktionskinetik. Zusätzlich alle 20 s Zuschalten von Sättigungsblitzen zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenz  $F'_M$  bzw. des minimalen Exzitonenflusses  $J'_M$  im helladaptierten Zustand. Bei 360 s Ausschalten des aktinischen Lichts zur Bestimmung der Grundfluoreszenz  $F'_0$  bzw. des maximalen Exzitonenflusses  $J'_0$  im helladaptierten Zustand sowie zur Untersuchung der Relaxationsmechanismen.

Blatt vorher dunkeladaptiert worden sein. In diesem Fall sind alle Reaktionszentren von

PS II geöffnet, d.h. der primäre Akzeptor  $Q_A$  ist vollständig oxidiert. Aus diesem Grund kann eine maximale Anzahl an Elektronen in die ETC fließen, die Fluoreszenz ist minimal.

2. Durch einen sättigenden Blitz von 0.7s Dauer und einer Intensität von ca.  $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  wird  $Q_A$  vollständig reduziert. Dies äußert sich bei einem dunkeladaptierten Blatt in einer maximalen Fluoreszenzantwort bzw. einem minimalen Exzitonenfluß ( $F_M$  bzw.  $J_M$ ).

3. Um eine charakteristische Fluoreszenzkinetik (Induktionskurve) auszulösen, wird aktinisches Licht (AL, typische Intensitäten: zwischen  $100$  und  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; im Beispiel:  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) zugeschaltet. Die Fluoreszenz  $F$  zeigt einen schnellen Anstieg, dem ein langsamer Abfall mit eventuell mehreren Nebenmaxima auf einen Gleichgewichtszustand ("Steady-State") folgt. Der Exzitonenfluß  $J_a$  verhält sich dazu invers.

4. Werden während der Induktionskurve in bestimmten zeitlichen Abständen erneut sättigende Blitze auf das Blatt gegeben, so wird die maximale Fluoreszenz  $F'_M$  im helladaptierten Zustand gemessen, die im Vergleich zu  $F_M$  durch anwachsendes nichtphotochemisches Quenching verringert ist. Der minimale Exzitonenfluß im helladaptierten Zustand ( $J'_M$  in Abbildung 3.4) ist durch den stärkeren thermischen Fluß im Vergleich zum dunkeladaptierten Zustand ( $J_M$ ) erhöht.

5. Nach Ausschalten des aktinischen Lichtes wird die Grundfluoreszenz  $F'_0$  im helladaptierten Zustand erreicht.  $F'_0$  kann wegen des nichtphotochemischen Quenchings tiefer als  $F_0$  liegen. Umgekehrt verhält es sich mit dem maximalen Exzitonenfluß im helladaptierten Zustand  $J'_0$ .

Aus obigen charakteristischen Fluoreszenzgrößen können die photochemischen und nicht-photochemischen Quenchingparameter

$$q_p = \frac{F'_M - F}{F'_M - F'_0} \quad (3.1)$$

$$q_N = 1 - \frac{F'_M - F'_0}{F_M - F_0} \quad (3.2)$$

sowie der Genty-Parameter  $\Phi_e$  (Genty et al., 1989)

$$\Phi_e = \frac{F'_M - F}{F'_M} \quad (3.3)$$

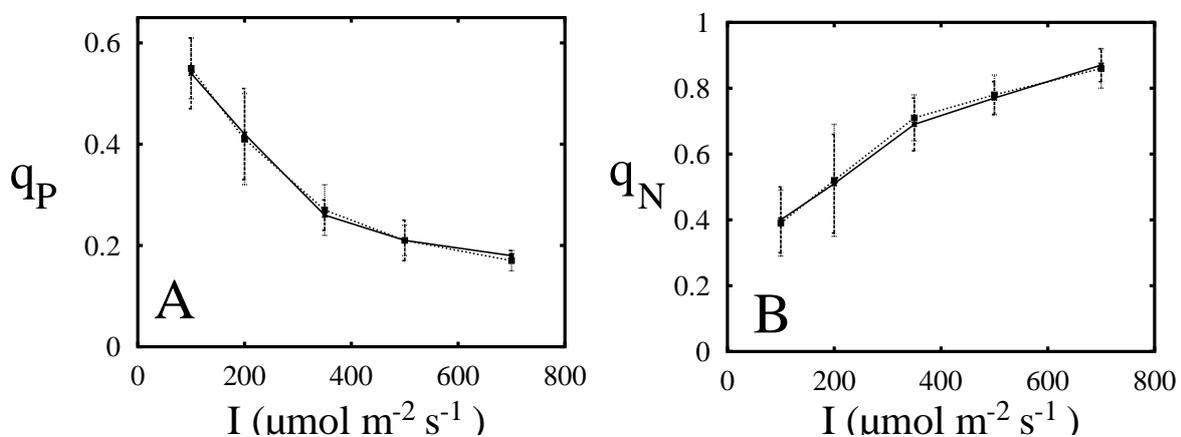
berechnet werden.

#### 3.2.4.4. Gegenüberstellung der beiden Meßmethoden

Es stellt sich die Frage, welchen Vorteil es hat, ein neues Verfahren wie die FC-Maschine zu entwickeln, wenn es bereits ein bewährtes Standardverfahren wie das PAM gibt.

Die Schwächen des PAM-Meßverfahrens werden deutlich, wenn die Fluoreszenz als "Potential" (wegen der Beziehung zum Exzitonenlevel, der die treibende Kraft für die Flüsse darstellt; Abbildung 3.1) betrachtet wird. Nur in linearen Systemen (wenn die Flüsse proportional zur treibenden Kraft sind) können die Flüsse mit Hilfe des Ohm'schen Gesetzes aus den Potentialen berechnet werden. Ein Problem, das durch die Nichtlinearität zwischen Flüssen und Chlorophyll-Fluoreszenz verursacht wird, ist die Variabilität des Skalierungsfaktors ( $\Delta$  Fluß/ $\Delta$  Signal). Wie schon von Horton (1996) diskutiert wurde, ist bei hoher thermischer Deaktivierung (oder großen Flüssen in die ETC) die Empfindlichkeit der variablen Fluoreszenz als Maß für ein zusätzliches Anwachsen in den Flüssen sehr gering. Dies kann zur Unterschätzung einer solchen Zunahme führen.

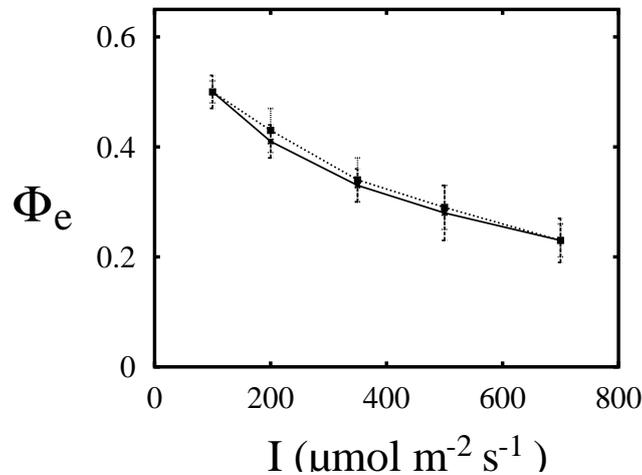
Zusätzlich wurde von Havaux et al. (1991) gezeigt, daß die zur Auswertung der PAM-Meßmethode verwendeten Quenching-Parameter  $q_p$  und  $q_N$  nicht nur photochemische und nichtphotochemische Prozesse widerspiegeln (wie es durch die Definition eigentlich gegeben ist), sondern beide Parameter sowohl photochemische als auch nichtphotochemische Prozesse beinhalten. Walters und Horton (1993) schlugen vor, statt dieser Parameter den Term  $1/F_0 - 1/F_M$  zu verwenden, um Änderungen in der Aktivität der Reaktionszentren zu beschreiben. Wie im Anhang von Schinner et al. (2000) gezeigt wird, entspricht der Term dem photochemischen Fluß  $J_p$ , wie er mit der FC-Maschine gemessen wird.



**Abbildung 3.5.:** Die Quenching-Parameter  $q_p$  (A) und  $q_N$  (B) gemessen bei verschiedenen Aktinlichtintensitäten mit der FC-Methode (durchgezogene Linie) und der LC-Methode (gestrichelte Linie). Es ist der Mittelwert aus fünf Messungen dargestellt.

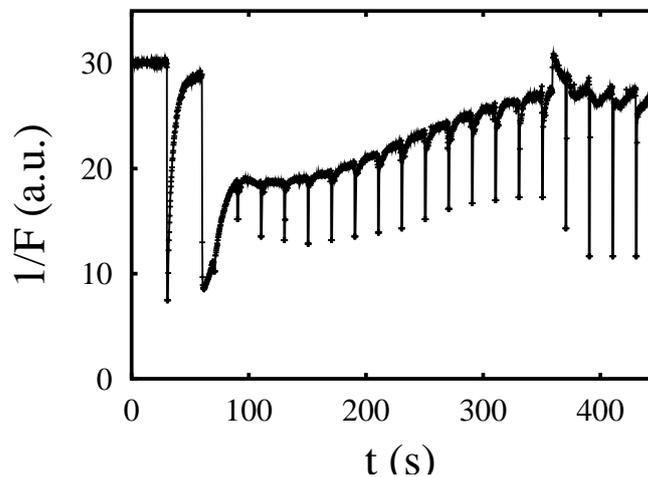
Zur Überprüfung der Gültigkeit der neuen Methode wurden sowohl mit dem LC-Verfahren als auch mit dem FC-Verfahren die charakteristischen Parameter  $q_p$ ,  $q_N$  und  $\Phi_e$  bestimmt und miteinander verglichen. Die Abbildungen 3.5 und 3.6 zeigen  $q_p$ ,  $q_N$  und  $\Phi_e$ , die aus Kurven wie in Abbildung 3.4 bei Aktinlichtintensitäten von 100, 200, 350, 500 und  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  berechnet wurden. Für die Berechnung wurden die Gleichungen 3.1, 3.2 und 3.3 (für die LC-Methode) und die entsprechend für die FC-Methode im Anhang A ab-

geleiteten Gleichungen A.29, A.30 und A.23 verwendet.



**Abbildung 3.6.:** Der Genty-Parameter  $\Phi_e$  gemessen bei verschiedenen Aktinlichtintensitäten mit der FC-Methode (durchgezogene Linie) und der LC-Methode (gestrichelte Linie). Es ist der Mittelwert aus fünf Messungen dargestellt.

Zwischen den numerischen Ergebnissen der beiden Methoden gibt es keinen Unterschied. Dies war auch zu erwarten, da die Charakteristiken des Blattes nicht von der Meßmethode abhängig sein sollten. Im folgenden werden einige Beispiele gezeigt, bei denen mit der FC-Methode eine bessere Auflösung der zugrundeliegenden Prozesse erzielt werden kann.



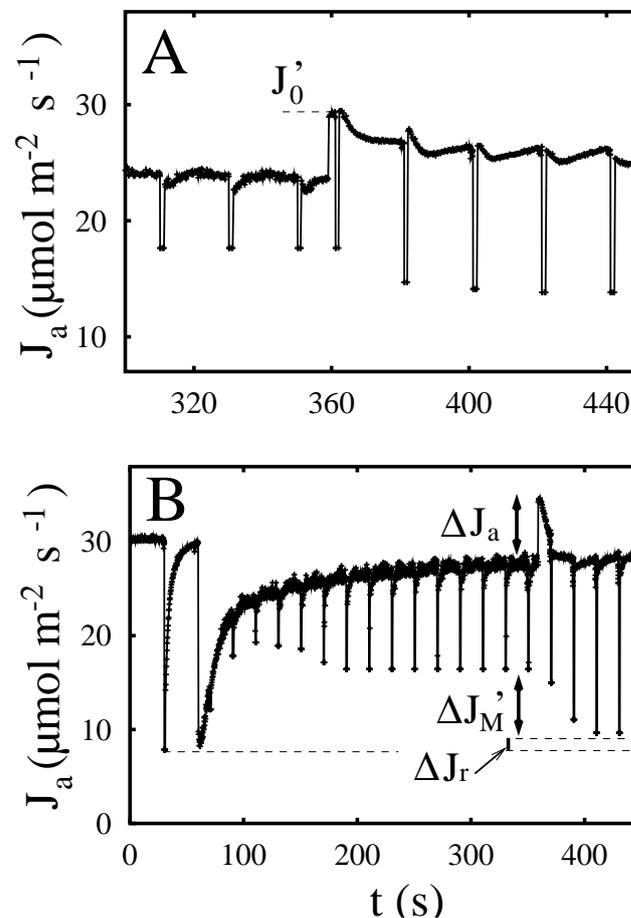
**Abbildung 3.7.:** Invertierung der in Abbildung 3.4 A dargestellten Kurve. Das Ergebnis ähnelt der mit der FC-Methode aufgenommenen Kurve in Abbildung 3.4 B.

Der mathematische Hintergrund der FC-Methode, der im Anhang A genauer abgehandelt wird, ergibt, daß die FC-Daten und die LC-Daten durch Inversion ineinander umgewandelt werden können (Gleichung A.20). Dies wird auch bei den in Abbildung 3.4 dargestellten

Meßdaten ersichtlich. Wird die mit der LC-Methode aufgezeichnete Kurve invertiert, ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei der FC-Messung (Abbildung 3.7).

Interessant ist der Bereich bei 360 s, wenn das aktinische Licht ausgeschaltet wird. Hier, bei hohen Flüssen aus den PS II-Antennen, ist der Sprung von  $F$  auf  $F'_0$  (Abbildung 3.4 A) weniger stark ausgeprägt als der Sprung von  $J_a$  auf  $J'_0$  (Abbildung 3.4 B). Abbildung 3.7 zeigt, daß die Information auch in der LC-Kurve enthalten ist und durch Inversion sichtbar gemacht werden kann. Dies geschieht allerdings mit einem Verlust an Genauigkeit.

Daß die Relaxationsprozesse nach Ausschalten von aktinischem Licht ein typisches Anwendungsgebiet für die FC-Methode sind, zeigt auch Abbildung 3.8.



**Abbildung 3.8.:** Analyse der Quenching-Mechanismen vor und nach dem Ausschalten von aktinischem Licht ( $I = 500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). (A) Veranschaulichung, daß das nichtphotochemische Quenching direkt nach Ausschalten des aktinischen Lichts konstant bleibt. (B) Aufzeigen zweier verschiedener nichtphotochemischer Quenchingmechanismen ( $\Delta J'_M$  und  $\Delta J_r$ ) mit unterschiedlichem Zeitverhalten und unterschiedlichen Auswirkungen auf  $J_M$  und  $J_0$ .  $\Delta J_a$ : Änderung im Gesamtfluß nach Ausschalten des aktinischen Lichts.

In Abbildung 3.8 A wird ersichtlich, daß direkt nach Ausschalten des aktinischen Lichts zwar

ein Sprung des Gesamtflusses auf den Wert  $J'_0$  stattfindet, aber die nichtphotochemischen Flüsse sich bis zum ersten Sättigungsblitz nach Ausschalten des Aktinlichts nicht verändert haben ( $J'_M \text{ (vor AL aus)} = J'_M \text{ (nach AL aus)}$ ). Dies ist eine sehr klare Demonstration des unterschiedlichen Zeitverhaltens von photochemischem und nicht-photochemischem Quenching. Es läßt sich dadurch erklären, daß der am schnellsten relaxierende Prozeß des nichtphotochemischen Quenchings (das Energy-Quenching) durch die Zeitkonstante der Relaxation des pH-Gradienten über der Thylakoidmembran bestimmt ist (Hansen et al., 1993), während die Zeitkonstanten des photochemischen Quenchings schneller sind.

Abbildung 3.8 B zeigt Details, die mit der LC-Methode kaum aufgenommen werden können. Während der photochemische Fluß in der gesamten Relaxationsphase nach Ausschalten des aktinischen Lichts (bei  $t = 360$  s) annähernd konstant bleibt, ändert sich der Wert von  $J'_M$  ( $\Delta J'_M$ ), bis er fast den Wert  $J_M$  vor Beleuchtung mit aktinischem Licht erreicht hat. Zwei Beobachtungen sind bei diesem Verhalten interessant:

1. Durch die beinahe gleich große Amplitude von  $\Delta J_a$  und  $\Delta J'_M$  wird deutlich, daß das Energy-Quenching sowohl auf  $F_M$  als auch auf  $F_0$  Auswirkungen hat (Bilger und Schreiber, 1986; Dau und Hansen, 1988, 1990).
2. Im Vergleich zum photochemischen Fluß vor Aktinlichtbeleuchtung ist  $J'_p \text{ (nach AL aus)}$  um ca. 12 % vermindert. Aufschluß über die fehlenden 12 % ergibt sich aus der Beobachtung, daß der nichtphotochemische Fluß nicht auf seinen ursprünglichen Wert vor Aktinlichtbeleuchtung zurückfällt, wie es durch die untere gestrichelte Linie angedeutet ist. Der zusätzliche nichtphotochemische Fluß  $\Delta J_r$  hat dieselbe Größenordnung wie die fehlenden 12 % im photochemischen Fluß  $J'_p$ . Dieses Verhalten deutet auf einen Prozeß hin, der ein Quenching in den Reaktionszentren verursacht. Inwieweit es sich dabei um Photoinhibitionsquenching handelt, müßte durch weitere Messungen untersucht werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die FC-Maschine Ergebnisse liefert, die zu denen der LC-Methode konsistent sind. Jedoch ergibt sich bei der FC-Methode ein direkteres Bild der zugrundeliegenden Flüsse. Das bessere Auflösungsvermögen basiert auf dem günstigeren Skalierungsfaktor (Gleichung A.27) bei hohem Quenching. Im Gegensatz dazu liefert die LC-Methode bessere Ergebnisse unter Bedingungen, bei denen geringes Quenching auftritt (weniger offene Reaktionszentren, niedrige thermische Deaktivierung).

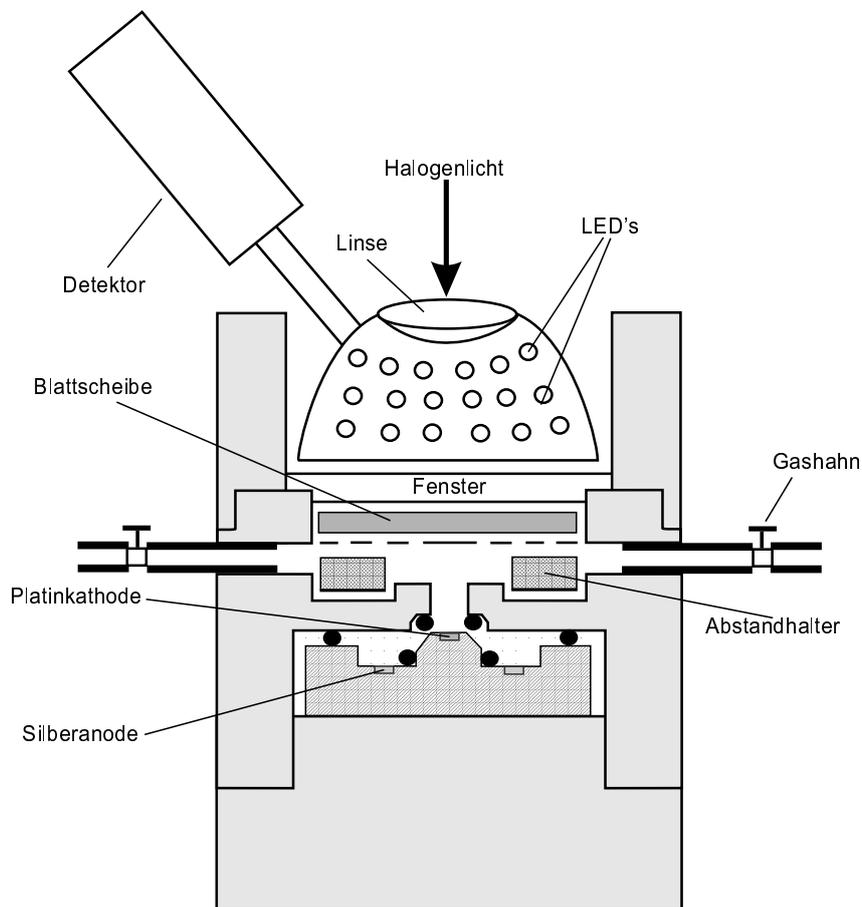
Weitere Details sind bei Schinner et al. (2000) dargestellt.

### 3.3. Sauerstoffmessungen mit der Clark-Elektrode

Wie in Kapitel 2 beschrieben finden in den Pflanzenzellen Prozesse statt, die Sauerstoff erzeugen oder verbrauchen.

Eine Messung der Netto-Sauerstoffbilanz ist mit Hilfe der Clark-Elektrode von Hansatech (LD2/2, Bachofer) möglich. Der schematische Aufbau der Meßkammer ist in Abbildung 3.9

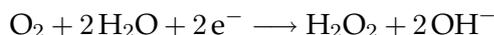
dargestellt.



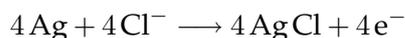
**Abbildung 3.9.:** Schematischer Aufbau der modifizierten Clark-Elektroden-Einheit von Hansatech. Das kreisrunde Blattstück befindet sich auf runden Abstandhaltern zwischen oberem und unterem Segment der Apparatur. Der  $O_2$ -Sensor liegt unterhalb des Blattes, wobei die Platinkathode der Atmosphäre der Blattkammer ausgesetzt ist. Über die Kuppel wird durch LEDs und Halogenlicht das aktinische Licht und das Meßlicht für die FC-Messungen bereitgestellt. Ein Detektor mißt die vom Blatt zurückgestrahlte Fluoreszenz. Die schwarzen Punkte stellen Dichtungs-O-Ringe dar.

Die eigentliche Clark-Elektrode besteht aus einer 2 mm großen Platinkathode und einer Silberanode, die beide in einen Plexiglaskörper eingefast sind. Die Kathode ist der Atmosphäre der Blattkammer ausgesetzt. Ein Elektrolyt stellt die Verbindung zwischen Anode und Kathode her. Mit einem Applikator, über den ein O-Ring gestülpt ist, wird eine Teflonmembran (PTFE-Folie,  $12,5 \mu\text{m}$  dick, Bachofer) der Größe  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  auf die Elektrode gespannt. Die Teflonmembran ist sauerstoffdurchlässig. Eine von außen angelegte Spannung von 0.6 bis 0.7 V liefert die treibende Kraft für die an der Platinkathode und der Silberanode stattfindenden Reaktionen:

- an der Platinkathode:

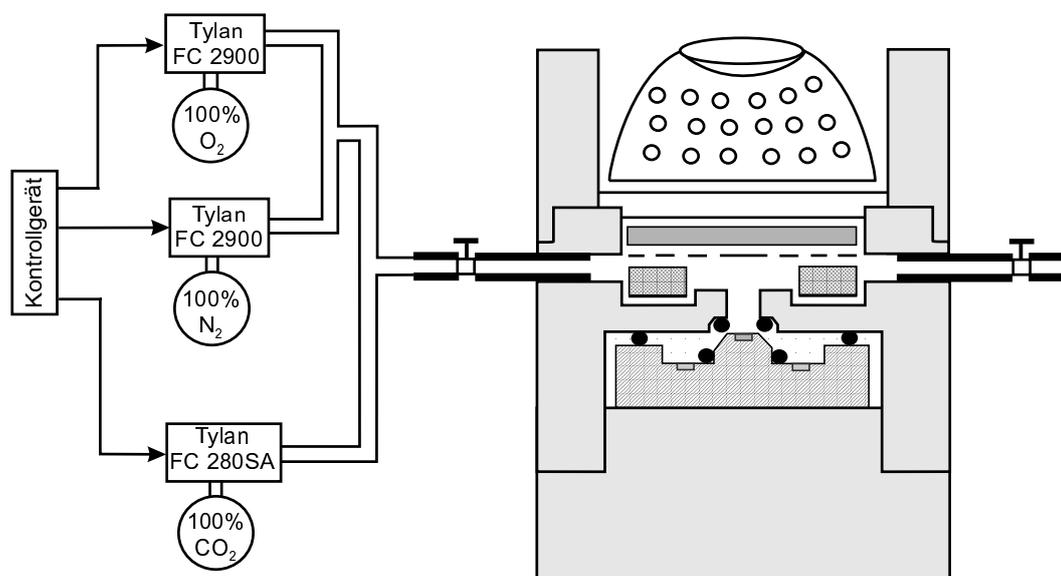


- an der Silberanode:



Durch obige Reaktionen entsteht ein zum Sauerstoffverbrauch an der Kathode proportionaler Strom. Dieser lässt sich im Strom-Spannungswandler in eine Spannung umwandeln und mit Hilfe des Meßrechners aufzeichnen.

Abbildung 3.9 zeigt den gesamten Meßaufbau, der Parallelmessungen von Sauerstoff (mit der Clark-Elektrode) und Fluoreszenz (mit der FC-Maschine) möglich macht. Dazu wurde die handelsübliche Kammer der Clark-Elektrode modifiziert. Der untere Teil blieb unverändert, der obere Teil wurde durch eine Kuppel ersetzt, in deren Bohrungen bis zu 20 LEDs zur Erzeugung des aktinischen Lichts bzw. des Meßlichts eingesetzt wurden. Sie beleuchten die 962 mm<sup>2</sup> große, kreisrunde Blattscheibe, die sich in der "Blattkammer" (dem Bereich zwischen oberem und unterem Segment) befindet.



**Abbildung 3.10.:** Schematischer Aufbau zur Einstellung spezieller Gasatmosphären. Über ein Kontrollgerät lassen sich die Durchflußwerte für die Tylan-Regler einstellen. Von den Reglern führen CO<sub>2</sub>-dichte Schläuche zur Blattkammer des Meßaufbaus. CO<sub>2</sub>-dichte Schläuche führen ebenfalls von den Gasreglern zu den Gasflaschen (N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>), die als Kreise angedeutet sind.

Das für die Sättigungsblitze (Abschnitt 3.2.4.3) und teilweise auch als aktinisches Licht benötigte Halogenlicht wurde durch einen Lichtleiter geleitet. Mit einer Stativhalterung konnte

der Lichtleiter über der Linse, die sich über der Kuppel für die LEDs befindet, positioniert werden. Die Linse gewährleistet die optimale Ausleuchtung des Blattes.

Mit dem Detektor, vor den ein RG9-Filter positioniert ist, wurde die vom Blatt zurückgestrahlte Fluoreszenz gemessen.

In der 5.22 ml großen Kammer der Clark-Elektroden-Einheit lassen sich verschiedene Gasatmosphären durch Flutung mit entsprechenden Gaskonzentrationen einstellen (Abbildung 3.10). Das Gas gelangt durch spezielle  $\text{CO}_2$ -dichte Schläuche (Polyethylen und Teflon), die mit den Gasreglern verbunden sind, über einen der beiden Gashähne in die Kammer.  $\text{CO}_2$ -dichte Schläuche führen ebenfalls von den Gasreglern zu den Gasflaschen ( $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$ ), die als Kreise in Abbildung 3.10 angedeutet sind.

Die Gaszusammensetzung wird über drei Gasflußregler (Tylan, Eching) kontrolliert. Über ein Kontrollgerät (Brüning, 1990) lassen sich die entsprechenden Durchflußwerte einstellen. Die Eichung der Tylan-Regler ist gasspezifisch, da sie mit der Wärmekapazität des Gases zusammenhängt. Durch Auffangen des Gases in einem invertierten, wassergefüllten Meßzylinder muß die Eichung für jedes Gas ermittelt werden.

### 3.4. Absorptionsmessungen bei $\lambda = 505 \text{ nm}$

Die zeitliche Änderung des Xanthophylls Zeaxanthin (Kapitel 2.2.1) unter Lichteinwirkung kann durch Absorptionsänderungen bei  $\lambda = 505 \text{ nm}$  bestimmt werden (Bilger et al., 1989). Für Messungen dieser Art wurde der von Bendixen (Bendixen, 1998; Bendixen et al., 2001) entwickelte Meßaufbau verwendet.

Das Meßlicht von  $\text{ca. } 0.7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  an der Blattoberfläche wurde durch sieben blaue LEDs (OL-ESB 41510, Oshino,  $\lambda = 450 \text{ nm}$ , moduliert mit 100 Hz) in Kombination mit einem 505 nm-Interferenzfilter ( $\lambda_0 = 505.5 \text{ nm}$ , Transmission = 46 %, Halbwertsbreite = 7.2 nm, Firma Schott) bereitgestellt. Zum Zeitpunkt der Entwicklung des Meßaufbaus standen keine LEDs zur Verfügung, deren Intensitätsmaximum bei 505 nm liegt. Als Alternative wurden LEDs verwendet, deren Intensitätsmaximum in der Nähe von 505 nm liegt. Oben genannte LEDs sind sehr breitbandig, weshalb es möglich ist, eine ausreichende Lichtintensität aus der Flanke herauszugreifen. Dies kann mit dem benutzten, stark begrenzenden Interferenzfilter mit möglichst hoher Transmission erfolgen.

Das Licht vor (Referenzsignal) und hinter dem Blatt (Absorptionssignal) wurde mit Hilfe von Photodioden (S1723-04, Hamamatsu) gemessen. Das Absorptionssignal wurde vom entsprechend abgeschwächten Referenzsignal abgezogen. Die Differenzbildung, die bei kleinen Schwankungen ( $10^{-3}$ ) die Quotientenbildung ersetzen kann, diente dazu, Schwankungen in der Meßlichtintensität zu eliminieren.

Das aktinische Licht mit einer Intensität von  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  wurde von der bereits im Zusammenhang mit den Fluoreszenz- und Sauerstoffmessungen genannten Halogenlampe

(Osram, HLX 64653, 24 V, 250 W) bereitgestellt. Sowohl das Meßlicht als auch das aktinische Licht wurden über einen Lichtleiter (Schölly Spezial) an die Blattoberfläche gebracht.

Ziel der Messungen ist es, Aussagen über relative Absorptionsänderungen während der Experimente zu machen. Das absolute Absorptionssignal ist allerdings stark von der Blattdicke bzw. vom Chlorophyllgehalt abhängig. Aus diesem Grund wurde eine implizite Normierung auf den Chlorophyllgehalt eingeführt, indem zu Beginn jeder Messung hinter der Blattprobe das gleiche Detektorsignal eingestellt wurde.

Die absorptionsbedingte Signaldifferenz wurde zur Glättung bzw. Verminderung des Signalrauschens in einer Integratorstufe verarbeitet und mit dem Meßrechner aufgenommen.

## 4. Unterschiedliche Resistenz von nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen gegenüber Lichtstreß

Pflanzen, die mit verschiedenen Stickstoffformen (Nitrat oder Ammonium) in der Nährlösung gezüchtet werden, zeigen eine unterschiedliche Resistenz gegenüber hohen Lichtintensitäten. Wie in der Einleitung besprochen, ist es Aufgabe dieser Arbeit, im Rahmen eines DFG-Projekts zusammen mit dem Institut für Pflanzenernährung der Universität Kiel Hinweise auf mögliche Ursachen für die Beobachtung zu finden, daß ammoniumernährte Pflanzen weniger resistent gegenüber Lichtstreß sind als nitraternährte.

Wie in Kapitel 5 gezeigt wird, werden Ammonium und Nitrat an verschiedenen Stellen der Pflanze assimiliert: Ammonium in den Wurzeln, Nitrat hauptsächlich in den Chloroplasten und dem Cytosol. Hieraus ergibt sich die Vermutung, daß der Einfluß von Nitrat auf photosynthetische Prozesse eine wichtige Rolle bei der unterschiedlichen Resistenz der Pflanzen gegenüber Lichtstreß spielt.

### 4.1. Stand der Forschung

Einige Vorgängerarbeiten im Rahmen des Stickstoffprojekts beschäftigten sich bereits damit, die Ursachen für das unterschiedliche Streßverhalten von nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen zu finden. Zum Verständnis der Intention dieser Arbeit wird im folgenden Abschnitt auf die Kernaussagen der Vorgängerarbeiten eingegangen.

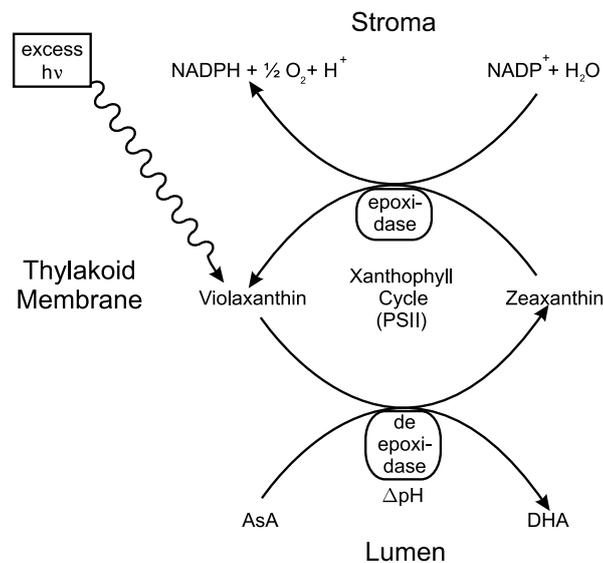
Lichtstreßuntersuchungen in der Photosynthese konzentrierten sich noch vor einigen Jahren auf Photosystem II (Aro et al., 1993; Lavergne und Leci, 1993; Park et al., 1995; Shen et al., 1996). Dies liegt zum einen am guten meßtechnischen Zugang über die Chlorophyll-Fluoreszenz als auch an der Vermutung, daß PS II mit dem empfindlichen D1-Protein von Lichtstreß unmittelbar betroffen sein müßte (Andersson et al., 1992; Barber und Andersson, 1991; Baroli und Melis, 1996). Besonders die thermische Deaktivierung in Form der beiden nichtphotochemischen Quenchingmechanismen, Energy-Quenching und Photoinhibition (Kapitel 3.2.2), steht häufig im Zentrum der Untersuchungen.

Energy-Quenching  $q_E$  spielt als thermische Deaktivierung des  $S_1$ -Zustandes (Kapitel 3.2.1)

für PS II eine wichtige Rolle. Sind die Pflanzen jedoch über längere Zeit hohen Lichtintensitäten ausgesetzt, kann es zu einer Inaktivierung des photosynthetischen Apparates, der Photoinhibition, kommen. Sie tritt auf, wenn die Pflanzen überschüssige absorbierte Lichtenergie nicht mehr über  $k_t$  (Abbildung 3.1) in ausreichendem Maße in Wärme umwandeln können. Inaktive (inhibierte) Reaktionszentren werden als eine Runterregelung des Photosystems betrachtet (Giersch und Krause, 1991), da diese Photozentren ebenfalls die Anregungsenergie deaktivieren ( $q_I$ ) (Lavergne und Leci, 1993; Ort und Whitmarsh, 1990). Meßtechnisch können die beiden Mechanismen durch ihr Zeitverhalten unterschieden werden: Während  $q_E$  im Sekundenbereich relaxiert, bleibt  $q_I$  über Stunden bestehen (Horton, 1996; Bendixen, 1998; Bendixen et al., 2001).

#### 4.1.1. Untersuchung der mit Photosystem II verbundenen Schutzmechanismen

Bendixen (1998) vermutete zu Beginn seiner Arbeit, daß sich aufgrund der unterschiedlichen Lichtresistenz von nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen Unterschiede in den nicht-photochemischen Quenchingprozessen zeigen müßten. Er fand aber bei den verschieden ernährten Pflanzenarten keine Unterschiede im Energy-Quenching (bei einer Aktinlichtintensität von  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und in der Photoinhibition.



**Abbildung 4.1.:** Darstellung des Xanthophyll-Zyklus. Unter starker Lichteinwirkung wird das an den PS II-Komplex gebundene Violaxanthin unter Mitwirkung von Ascorbat (AsA) zu Zeaxanthin reduziert. In Dunkel- oder Schwachlichtphasen wird dieser Prozeß durch die Epoxidase umgekehrt. Die Enzyme sind pH-reguliert. (Alscher et al., 1997).

Eine bedeutende Rolle in der thermischen Deaktivierung von Anregungsenergie in den Antennenkomplexen der Photosysteme spielt die Bildung von Zeaxanthin, einem Schutz-Carotinoid (Abbildung 4.1, Demmig-Adams, 1990; Verhoeven et al., 1997). Aus diesem

Grund wurde von Bendixen (Bendixen, 1998; Bendixen et al., 2001) und auch im Rahmen dieser Arbeit (Kapitel 7.4) mit Hilfe von Absorptionsmessungen bei  $\lambda = 505$  nm die Bildung von Zeaxanthin untersucht.

Die Messungen ergaben eine starke Zeaxanthinbildung in nitraternährten Pflanzen, die abhängig von der eingestrahlten Lichtintensität war. Bei den ammoniumernährten Pflanzen trat hingegen nur eine äußerst geringe Zeaxanthin-Bildung auf. Nach Zugabe von Ascorbat (AsA), einem wichtigen Kofaktor zur Bildung von Zeaxanthin (Abbildung 4.1), waren allerdings auch die ammoniumernährten Pflanzen in der Lage, licht-stimuliert Zeaxanthin zu bilden.

DTT (Dithiothreitol), ein Inhibitor der Zeaxanthin-Bildung (Adams et al., 1990; Bilger und Björkman, 1990; Neubauer, 1993; Pfündel und Bilger, 1994), bewirkte bei den nitraternährten Pflanzen eine Abnahme der Zeaxanthin-Bildung mit einer gleichzeitigen Zunahme der Photoinhibition. Dies läßt darauf schließen, daß die Zeaxanthin-Bildung in den nitraternährten Pflanzen in Übereinstimmung mit der Literatur einen Schutzmechanismus gegen Lichtstreß darstellt.

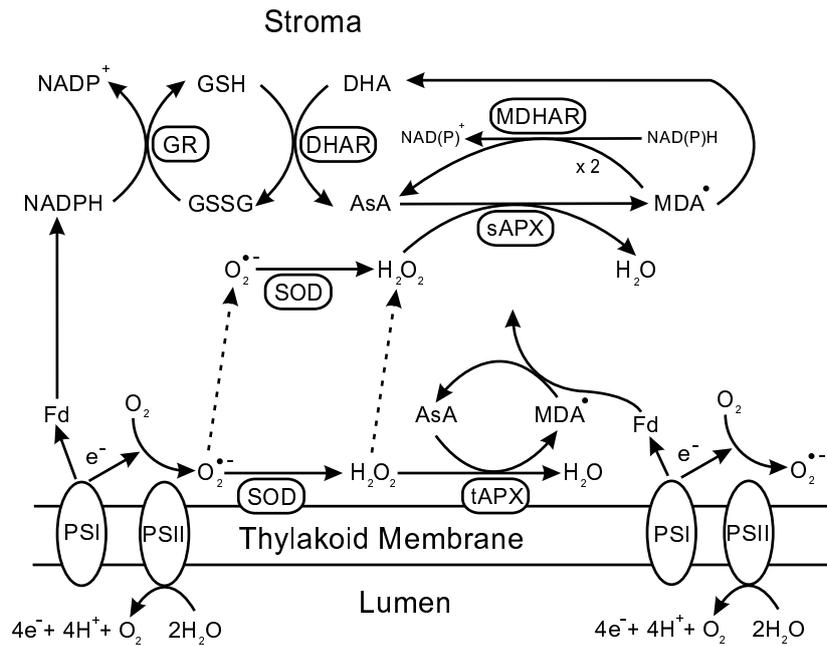
Unklar ist, welchen Schutzmechanismus die ammoniumernährten Pflanzen besitzen. Da keine erhöhte Photoinhibition auftritt, sind andere Mechanismen in Betracht zu ziehen. Ein Erklärungsansatz ist der eines mit gesteigertem Umsatz arbeitenden Reparaturzyklus. Ein solcher Reparaturzyklus würde hohe "metabolische Kosten" verursachen, was sich u.a. auch in einem Mangel an Ascorbat (AsA) äußern könnte.

Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden biochemische Untersuchungen gemacht, die sich darauf konzentrierten, den Ascorbatmangel von Ammoniumpflanzen näher zu untersuchen.

#### **4.1.2. Lipidperoxidation und Aktivität von radikalfangenden Enzymen**

Biochemische Untersuchungen (Zhu et al., 2000) ergaben eine Abnahme des Ascorbat-Gehalts bei ammoniumernährten Pflanzen, die unter Starklichtbedingungen angezogen wurden. Gleichzeitig wurde eine erhöhte Lipidperoxidation sowie eine erhöhte Aktivität der vier  $H_2O_2$ -fangenden Enzyme (Ascorbat-Peroxidase (APX), Monodehydroascorbat-Reduktase (MDHAR), Dehydroascorbat-Reduktase (DHAR), Glutathion-Reduktase (GR), Abbildung 4.2) beobachtet.

Reaktiver Sauerstoff kann auch in den Peroxisomen und den Mitochondrien entstehen. Auch dort laufen ähnliche Detoxifizierungsprozesse ab, wie sie in Abbildung 4.2 für den Chloroplasten dargestellt sind. Zu Beginn des Projekts stand jedoch die Mehler-Reaktion an PS I (Abbildung 4.2) als mögliche Hauptverursacherin des Ascorbatmangels und der erhöhten Lipidperoxidation in ammoniumernährten Pflanzen im Zentrum der Untersuchungen.

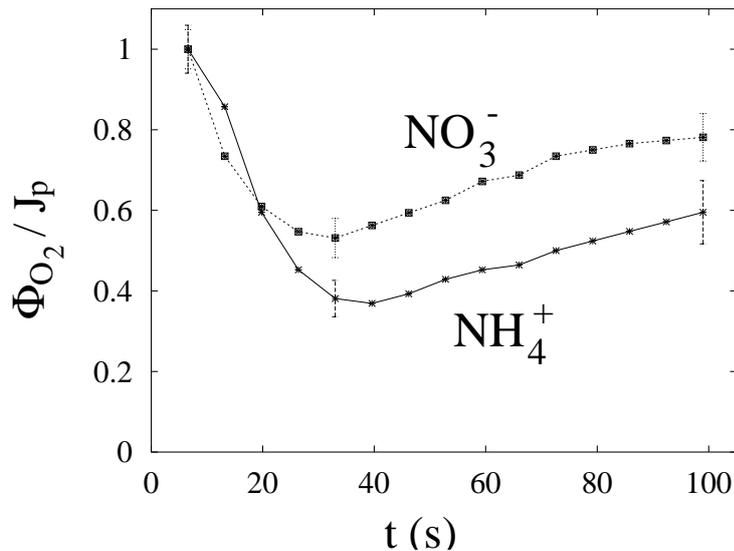


**Abbildung 4.2.:** Detoxifikation der Sauerstoffradikale in den Chloroplasten. Beim Detoxifikationsprozess an der Thylakoidmembran findet unter Beteiligung der Superoxiddismutase (SOD) eine Dismutationsreaktion statt. Hierbei entsteht Wasserstoffsuperoxid ( $H_2O_2$ ). Dies wird unter Beteiligung des Enzyms Ascorbatperoxidase (tAPX), das an die Thylakoidmembran gebunden ist, durch Ascorbat (AsA) reduziert. Dabei wird gleichzeitig Monodehydroascorbat (MDA) gebildet. Für die Regeneration von Ascorbat aus MDA sind Elektronen von PS I notwendig. Im stomatischen Detoxifikationsprozess entsteht unter Beteiligung der SOD und der stomatischen sAPX ebenfalls MDA. Dieses Radikal kann durch die Monodehydroascorbat-Reduktase (MDHAR) in Ascorbat (AsA) umgewandelt werden. Die Reduktion von Dehydroascorbat (DHA) zu Ascorbat (AsA) wird durch die Dehydroascorbat-Reduktase (DHAR) über den Ascorbat-Glutathion-Weg katalysiert. Dazu wird NADPH aus der photosynthetischen Elektronentransportkette benötigt. (Alscher et al., 1997).

#### 4.1.3. Unterschiedliche Aktivität der Mehler-Reaktion

Eine direkte meßtechnische Erfassung der Mehler-Reaktion in intakten Blättern ist sehr schwierig. In Vorgängerarbeiten (Tabrizi, 1997; Schinner et al., 1998) wurden simultan FC- und photoakustische Messungen durchgeführt. Hierbei wird der mit der FC-Maschine gemessene Elektronenfluß am PS II mit der photoakustisch bestimmten Sauerstoffentwicklung verglichen. Die Photoakustik hat den Vorteil, daß sie nur Prozesse detektiert, die innerhalb von 35 ms nach einem Lichtpuls ablaufen. Eine mögliche Beteiligung der Photorespiration kann dann ausgeschlossen werden, da dieser Prozeß erst ca. 100 ms nach einem Lichtpuls auftritt und somit keinen Einfluß auf die im Zeitbereich von 35 ms gemessenen Photoakustik-Antworten hat.

Die Schemata der Photosynthese (Abbildung 2.2) zeigen eine strenge Kopplung zwischen



**Abbildung 4.3.:** Das Verhältnis von photoakustisch bestimmter Sauerstoffentwicklung zu Elektronenfluß ( $\Phi_{O_2}/J_p$ ) in nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern. Zum besseren Vergleich wurde der erste Punkt jeder Kurve auf 1 gesetzt. Gemeinsame Messung mit Tabrizi (1997).

der Sauerstoffentwicklung und dem Elektronenfluß an PS II. Abweichungen von dieser Kopplung können bei der Nettosauerstoffentwicklung auftreten, wenn der am PS II entstandene Sauerstoff von der Mehler-Reaktion wieder eingefangen wird (Abbildungen 2.2 und 4.2, Schreiber und Neubauer, 1990).

Abbildung 4.3 zeigt den Quotienten aus Sauerstoffentwicklung und Elektronenfluß bei nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern. Hieraus wird ersichtlich, daß der  $O_2$ -Verbrauch der ammoniumernährten Pflanzen größer ist als der der nitraternährten Proben. Dies wurde als Indiz für eine höhere Aktivität der Mehler-Reaktion bei Ammoniumpflanzen gedeutet.

#### 4.1.4. Unterschiedliche Gruppen von PS I-Akzeptoren

Da sich aus den Messungen der Mehler-Reaktion herauskristallisierte, daß sich dieser Elektronenakzeptor hinter PS I bei nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen unterschiedlich verhielt, wurde untersucht, ob dies auch für die anderen Elektronenakzeptoren gilt und inwieweit sich diese in ihrer Wirkungsweise gegenseitig beeinflussen.

In der vorangegangenen Diplomarbeit (Schinner, 1997) wurde daher mit Hilfe der FC-Methode die Stimulierbarkeit von PS I in nitrat- und ammoniumernährten Bohnen gemessen. Dabei wurden auch die Inhibitoren Antimycin A zur Inhibition des zyklischen Transportes um PS I und Glyceraldehyd zur Inhibition des Calvin-Zyklus eingesetzt.

#### 4.1.4.1. Stimulierbarkeit von PS I in Abhängigkeit von Antimycin A und Glyceraldehyd

PS I läßt sich selektiv mit fernrotem Licht (FR-Licht,  $\lambda > 700$  nm) anregen. Dies bewirkt eine Saugwirkung von PS I auf die ETC, die zu einer verstärkten Reoxidation von  $Q_A^-$  führt. Der damit verbundene zusätzliche Elektronenfluß dient als Maß für die Stimulierbarkeit der unterschiedlichen PS I-Akzeptoren.

Unter Kontrollbedingungen traten keine Unterschiede in der Stimulierbarkeit von PS I zwischen nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern auf. Bei nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern, die mit  $5 \mu\text{M}$  Antimycin A inhibiert wurden, ließ sich im Vergleich zu den Kontrollmessungen kein Antimycin A-Effekt bei den ammoniumernährten Blättern erkennen. Bei den nitraternährten Blättern hingegen trat eine verminderte Stimulierbarkeit von PS I auf.

Bei Messungen an Blättern, die mit Glyceraldehyd vergiftet wurden, trat ein gegenteiliger Effekt ein: bei den nitraternährten Blättern bewirkte der Inhibitor keine Veränderung des PS I-stimulierten Elektronenflusses, bei den ammoniumernährten Blättern trat nach Zugabe von Glyceraldehyd sogar eine Erhöhung des zusätzlichen Elektronenflusses im Vergleich zur Kontrollmessung auf.

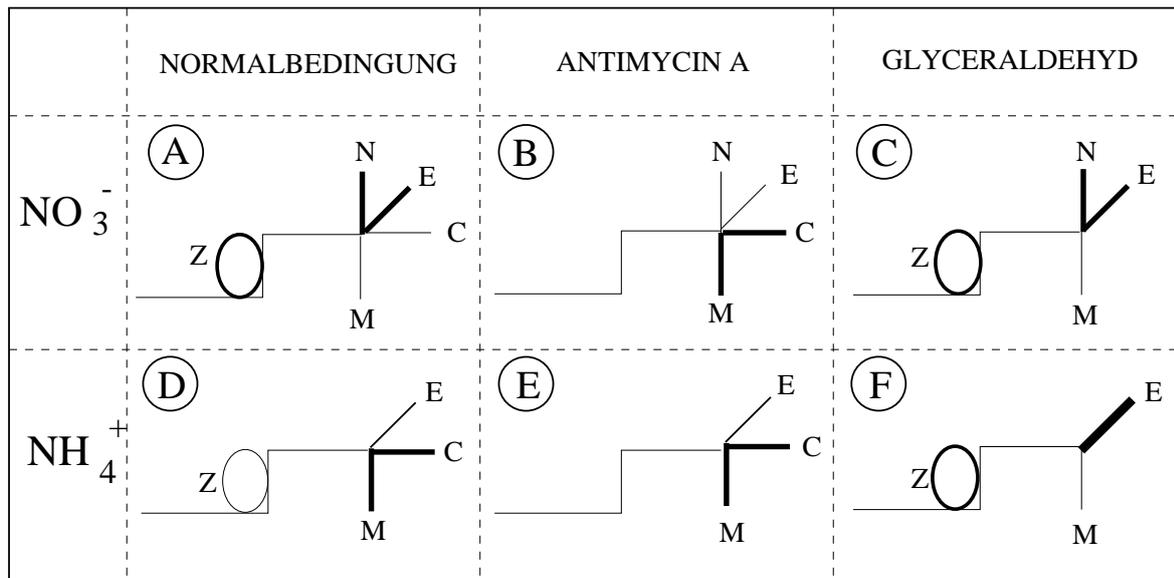
#### 4.1.4.2. Frühere Hypothese der Stoffwechselumstellung der PS I-Akzeptoren

Zur Interpretation der Messungen wurde die Hypothese (die sich damals noch auf die Prozesse im Chloroplasten konzentrierte) entwickelt, daß es an PS I zwei Akzeptorengruppen gibt (Abbildung 4.4):

- zyklischer Elektronentransport um PS I (Z in Abbildung 4.4), Stickstoffassimilation (N) und Malatexport (E) bilden eine durch FR-Licht stimulierbare Gruppe von PS I-Akzeptoren (Gruppe 1).
- Calvin-Zyklus (C in Abbildung 4.4) und Mehler-Reaktion (M) bilden eine schwach stimulierbare Gruppe von PS I-Akzeptoren (Gruppe 2).
- unter Normalbedingungen dominiert bei Nitratpflanzen Gruppe 1 (Abbildung 4.4 A), bei Ammoniumpflanzen Gruppe 2 (Abbildung 4.4 D).

Die Giftwirkungen lassen sich mit diesen drei Annahmen wie folgt erklären:

- Antimycin A blockiert bei Nitratpflanzen den zyklischen Elektronentransport. Das senkt die Aktivität der ersten Gruppe und verlagert sie auf die zweite. Diese ist weniger durch FR-Licht stimulierbar (Abbildung 4.4 B). Dadurch wird die FR-Antwort vermindert. Bei den Ammoniumpflanzen tritt dieser Effekt nicht auf, da hier Gruppe 2 sowieso dominiert (Abbildung 4.4 E).



**Abbildung 4.4.:** Hypothese der Stoffwechsellumstellung bei ammonium- bzw. nitraternährten Pflanzen nach Zugabe der Inhibitoren Antimycin A und Glyceraldehyd. Die Abkürzungen bedeuten: Z: zyklischer Elektronentransport, C: Calvin-Zyklus, N: Nitratreduktase, E: Export=Malatventil, M: Mehler-Reaktion. Die Dicke der Striche deutet die Ausprägung des jeweiligen Prozesses an.

- Glyceraldehyd verändert wenig bei den  $\text{NO}_3^-$ -Pflanzen (Abbildung 4.4 C). Es wird zwar die Aktivität des Calvin-Zyklus vermindert, das kann aber durch Z, N und E aufgefangen werden. Bei  $\text{NH}_4^+$ -Pflanzen hingegen verschiebt Glyceraldehyd den Stoffwechsel von Gruppe 2 zu Gruppe 1 (Abbildung 4.4 F). Gruppe 1 besteht allerdings bei  $\text{NH}_4^+$ -Pflanzen nur aus zyklischem Elektronentransport und Malatexport, da die Stickstoffassimilation hier eine geringe Rolle spielt. Die FR-Empfindlichkeit steigt.

Die FR-Empfindlichkeit der Blätter war stark von der Jahreszeit abhängig. Obige Ergebnisse und Diskussion beziehen sich auf Messungen an Pflanzen, die im Sommer angezogen wurden ("Sommerpflanzen"). Im Winter waren die ammoniumernährten Pflanzen wesentlich schlechter durch FR-Licht stimulierbar. Dadurch konnte die Wirkung von Inhibitoren auf den FR-Effekt kaum abgeschätzt werden. Nitrat-Winterpflanzen waren empfindlicher gegenüber Glyceraldehyd als gegenüber Antimycin A. Es wurde angenommen, daß der jahreszeitliche Unterschied darin liegt, daß Gruppe 1 der PS I-Akzeptoren (Abbildung 4.4) auch bei den Winter-Nitrat-Pflanzen schwach ausgeprägt ist. Glyceraldehyd kann dann nicht zu einer Stimulation der FR-Antwort wie bei den Ammonium-Sommerpflanzen führen, weil Gruppe 1 fehlt. Stattdessen führt die Blockierung des Calvin-Zyklus zu einer generellen Abnahme an Akzeptoren und damit zu einer Reduktion der FR-Antwort.

Bei obiger Interpretation der Ergebnisse wurde ausschließlich die Wirkung der Inhibitoren auf die Prozesse innerhalb des Chloroplasten berücksichtigt. Der Effekt von Antimycin A

auf den Cytochrom-Weg in den Mitochondrien sowie die Wirkung von Glycerinaldehyd auf die Photorespiration mit Auswirkungen auch auf die Peroxisomen und Mitochondrien wurden außer Acht gelassen. Auch die erhöhte Lipidperoxidation und die erhöhte Aktivität der vier  $H_2O_2$ -fangenden Enzyme wurde hauptsächlich auf eine stärkere Aktivität der Mehler-Reaktion in den Chloroplasten zurückgeführt. Inwieweit dies zulässig war, wird sich auf Grundlage der Ergebnisse dieser Dissertation zeigen.

## 5. Lokalisierung der Stickstoffassimilation in den verwendeten Buschbohnen

Ammonium bzw. Nitrat stellen ca. 80 % der gesamten Ionen dar, die von der Pflanze über die Wurzeln aufgenommen werden (Marschner, 1995). Die Form des Stickstoffangebots hat also einen starken Einfluß auf die Aufnahme anderer Kationen und Anionen sowie die zelluläre pH-Wert-Regulierung und den Energiestoffwechsel in den Wurzeln. Außerdem wird vermutet, daß Nitrat nicht nur als Nährstoff dient, sondern als Signalstoff stimulierend auf das Wachstum der Wurzeln wirkt (Zhang et al., 1999).

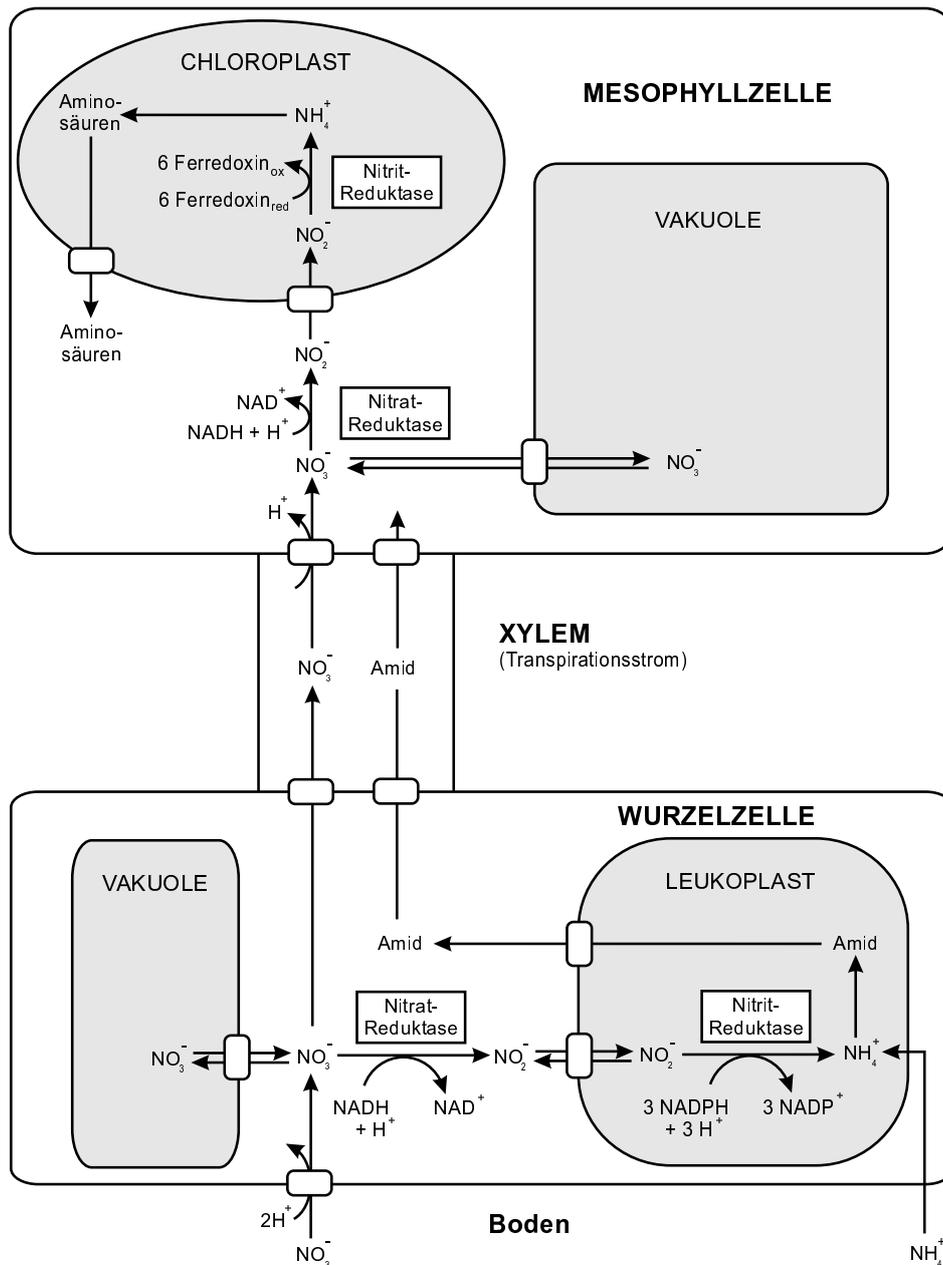
Bei Ammoniumernährung wird der Stickstoff in der Wurzel assimiliert, während die Nitratassimilation sowohl in den Wurzeln als auch in den Blättern stattfinden kann (Abbildung 5.1). Bei den meisten ausgewachsenen krautigen Pflanzen tragen die Blätter den Hauptanteil der Nitratassimilation. Bei vielen Holzpflanzen hingegen ist die Nitratassimilation auf die Wurzeln konzentriert (Heldt, 1999).

Im folgenden Abschnitt soll geklärt werden, ob die Nitratassimilation der verwendeten Buschbohnen hauptsächlich in den Blättern oder in den Wurzeln stattfindet. Damit wird überprüft, ob die nötigen Voraussetzungen vorliegen, im Hinblick auf stickstoffspezifische Unterschiede Messungen an Blättern vorzunehmen.

Ein guter Indikator für die in der Wurzel stattfindenden Prozesse ist die Sauerstoffaufnahme, die sogenannte Wurzelatmung. Da bei Ammoniumernährung die Assimilation auf jeden Fall in der Wurzel stattfindet (Abbildung 5.1), haben ammoniumernährte Pflanzen einen hohen Bedarf an Reduktionsäquivalenten und ATP in den Wurzeln (Salsac et al., 1987; Marschner, 1995). Dies zeigt sich über die Sauerstoffaufnahme (Cramer und Lewis, 1993).

Außerdem wurde bei hohen Ammoniumkonzentrationen ein für die Pflanze nutzloser Kreislauf des Ammoniums beobachtet (Britto et al., 2001): Bis zu 80 % des über die Wurzelzellen aufgenommenen Ammoniums werden wieder ausgeschieden. Da die Aufnahme gegen einen hohen Gradienten erfolgt, ist dieser Prozeß mit hohen metabolischen Kosten verbunden. So wurde unter diesen Bedingungen eine Zunahme der Wurzelatmung um 40 % gemessen.

Würde die Nitratassimilation bei den nitraternährten Pflanzen hauptsächlich in den Blättern stattfinden, wäre ihre Dunkelatmung im Vergleich zu den ammoniumernährten Pflanzen ge-



**Abbildung 5.1.:** Nitratassimilation in den Wurzeln und den Blättern einer Pflanze. Das Nitrat aus dem Boden wird durch die Wurzel aufgenommen. In der Wurzel kann es in der Vakuole gespeichert oder in den Zellen der Wurzelepidermis und -cortex assimiliert werden. Das Nitrat kann aber auch über den Transpirationsstrom durch die Xylemgefäße in die Mesophyllzellen gelangen. Dort kann eine Zwischenspeicherung in der Vakuole stattfinden. Im Cytosol erfolgt die Reduktion des Nitrats zum Nitrit und in den Chloroplasten zum  $\text{NH}_4^+$ , aus dem die Aminosäuren gebildet werden (Heldt, 1999). Zusätzlich ist die Aufnahme von Ammonium aus dem Boden eingezeichnet.

---

ringer. In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben über den Umfang der Erhöhung der Dunkelatmung bei Ammoniumernährung in Abhängigkeit von den Aufzuchtbedingungen und den verwendeten Stickstoffkonzentrationen. So fanden Mata et al. (1996) bei Korkeiche (*Quercus suber*) keinen Unterschied in der Wurzelatmung in Abhängigkeit von der angebotenen Stickstoffvariante, da es sich hierbei um eine Holzpflanze handelt, die auch Nitrat in der Wurzel assimiliert. Marschner (1995) hingegen erwähnt bei Gurken eine Verdopplung der Sauerstoffaufnahme in den Wurzeln bei Ammoniumernährung.

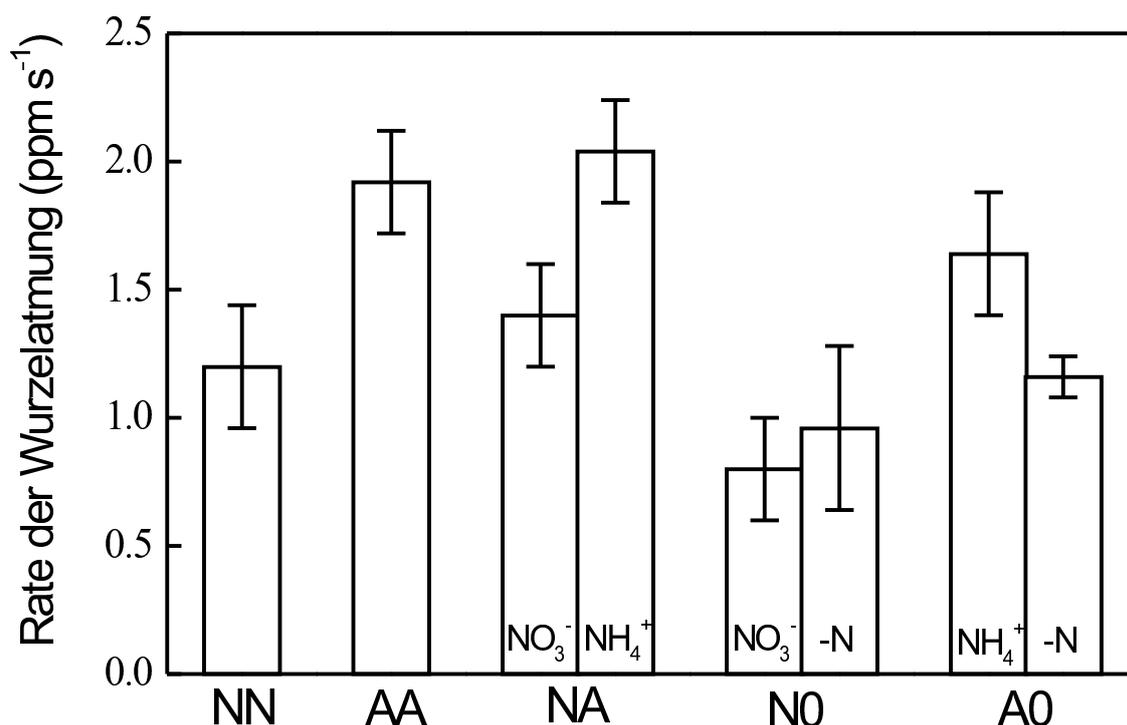
Der hier durchgeführte Versuch fand in Kooperation mit Guo (Institut für Pflanzenernährung) im Split-Root-Experiment statt. Dazu wurden während der Anzucht die Wurzeln in zwei gleiche Teile geteilt und in zwei nebeneinanderstehende Behälter gesetzt. Diese Behälter waren entweder beide mit Nitrat(NN)- oder Ammonium(AA)-Nährlösung, eine Seite mit Nitrat- und die andere mit Ammoniumnährlösung (NA) oder jeweils eine Seite mit Nitrat- oder Ammoniumnährlösung und die andere Seite mit Stickstoff freier Nährlösung (N0 oder A0) gefüllt (Kapitel 3.1).

Zur Bestimmung der Wurzelatmung wurden 150 mg der Wurzelenden abgeschnitten und in die Kammer der Clark-Elektrode gebracht. Der Sauerstoffverbrauch wurde über den Zeitraum von 5 min gemessen. Testmessungen ergaben, daß die Atmung mehr als 30 min nach Abschneiden der Wurzeln konstant blieb. Die Rate des Sauerstoffverbrauchs wurde bestimmt, indem die Änderung im Sauerstoffverbrauch durch das zugehörige Zeitintervall dividiert wurde.

Abbildung 5.2 zeigt, daß bei allen Messungen die Rate der Wurzelatmung in Ammoniumnährlösung deutlich höher lag, unabhängig von der Nährlösung auf der anderen Seite (Ammonium, Nitrat oder Stickstoff frei). Dies läßt darauf schließen, daß in den Wurzeln der ammoniumernährten Pflanzen ein höherer Verbrauch von Energie stattfindet als in den nitraternährten Pflanzen. Diese scheinen das Nitrat hauptsächlich in den Blättern zu assimilieren. Ob im Gegensatz dazu ihr Energiebedarf in den Blattzellen höher ist, wird anhand von Messungen der Dunkelatmung an Blättern in Kapitel 10 ausführlicher diskutiert.

Unterschiede in der Wurzelatmung bei Nitrat- und Ammoniumernährung können auch auf eine unterschiedliche Verteilung des Cytochrom-Weges und des Alternativen Weges an der Gesamtatmung zurückzuführen sein (Blacquiére, 1987). Bei Stickstoff-Mangel-Pflanzen, denen Ammonium zugegeben wurde, nahm der Anteil des Alternativen Weges an der Gesamtwurzelatmung zu. Dies führte zu einer höheren Gesamtatmung, um dieselbe Energiemenge zu erzeugen (Lambers et al., 1996).

Der Anteil des Alternativen Weges an der Gesamtatmung liegt in den Wurzeln bei bis zu 50 % (Marschner, 1995; Millar et al., 1998). Für Blattzellen werden in der Literatur Werte von maximal 28 % für den Anteil der Alternativen Oxidase angegeben (Affourtit et al., 2001). Der Alternative Weg scheint also in Wurzeln eine größere Rolle zu spielen als in Blattzellen. Daher liegt es nahe, die Wurzeln mit SHAM, einem Inhibitor des Alternativen Weges, zu

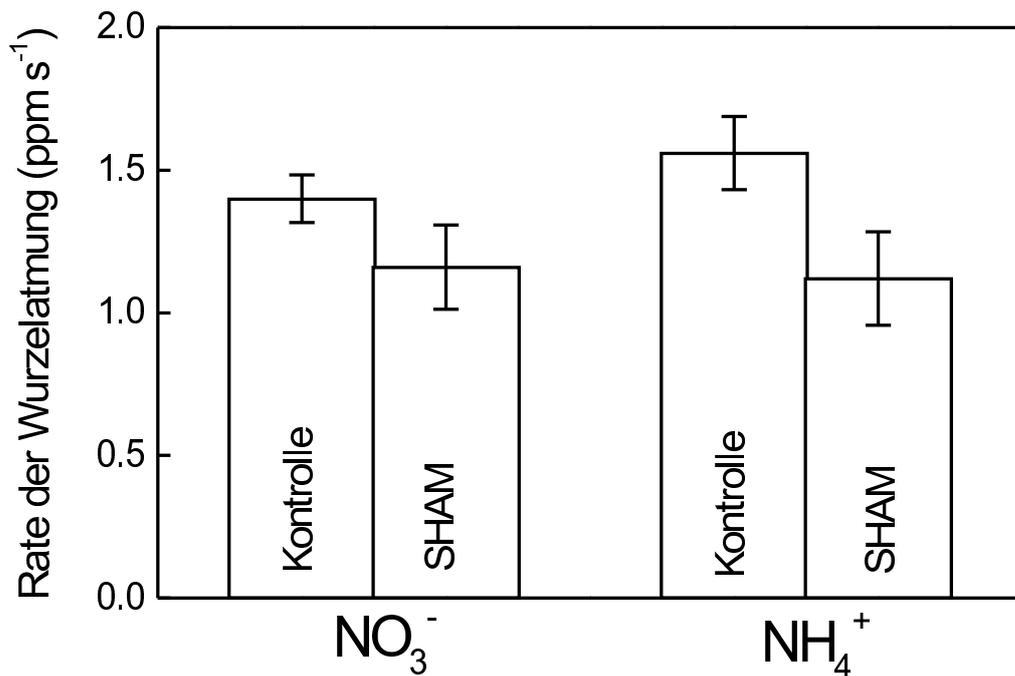


**Abbildung 5.2.:** Rate der Wurzelatmung im Split-Root-Experiment. NN: beide Behälter beinhalten Nitratnährlösung, AA: beide Behälter beinhalten Ammoniumnährlösung, NA: eine Seite ist mit Nitratnährlösung gefüllt, die andere mit Ammoniumnährlösung, NO/A0: eine Seite ist mit Nitrat- bzw. Ammoniumnährlösung gefüllt, die andere mit Stickstoff freier Nährlösung (-N). Die Daten stellen Mittelwerte von vier Messungen dar.

vergiften. Dazu wurden die Wurzeln der ammonium- und nitraternährten Pflanzen für zwei Stunden in eine SHAM-Lösung (8 mM) gebracht. Wiederum wurden 150 mg der Wurzeln abgeschnitten und in der Kammer der Clark-Elektrode der Sauerstoffverbrauch über den Zeitraum von 5 min gemessen (Abbildung 5.3).

Während die oben genannten Split-Root-Messungen im Sommer (Juli/August) durchgeführt wurden, fanden die Inhibitionsmessungen mit SHAM im Dezember statt. Schon die Kontrollmessungen ergeben ein anderes Bild als im Sommer (Abbildung 5.3). Die Unterschiede in der Atmung zwischen Nitrat- und Ammoniumernährung sind fast verschwunden. Dennoch zeigt sich in der Differenz zwischen der Wurzelatmung unter Kontrollbedingungen und der Wurzelatmung unter SHAM-Vergiftung ein stickstoffspezifischer Unterschied, der allerdings bei Messungen im Sommer signifikanter ausgefallen wäre.

Wie schon im Zusammenhang mit der vorangegangenen Diplomarbeit (Schinner, 1997) in Kapitel 4.1.4 erwähnt, zeigten sich auch hier bei der Durchführung der Experimente saisonale Unterschiede. Die stickstoffspezifischen Unterschiede waren während der Wintermonate schwächer ausgeprägt als im Frühjahr und Sommer. Dieses Phänomen wurde auch von Guo (2001) beobachtet, der an denselben Pflanzen u.a. CO<sub>2</sub>-Gasflußmessungen durchführte.



**Abbildung 5.3.:** *Durch SHAM inhibierte Rate der Wurzelatmung. Die Daten stellen Mittelwerte von vier Messungen dar.*

Die in diesem Abschnitt gezeigten Messungen ergaben zwei Ergebnisse:

1. Die hier verwendeten Buschbohnen erfüllen die Voraussetzung für die geplanten stickstoffspezifischen Untersuchungen an Blättern, da bei den nitraternährten Pflanzen die Nitratassimilation hauptsächlich in den Blättern stattfindet, was sich in der geringeren Wurzelatmung im Vergleich zu den ammoniumernährten Pflanzen äußert.
2. Ein Problem sind die jahreszeitlichen Schwankungen der stickstoffspezifischen Unterschiede. Dieser Effekt muß bei der Interpretation der Messungen mitberücksichtigt werden.

## 6. Unterschiede in der Blattmorphologie

Nachdem im vorherigen Kapitel überprüft wurde, daß bei den nitraternährten Pflanzen die Nitratassimilation hauptsächlich in den Blättern stattfindet und sich damit das Hauptinteresse der Lichtstreßuntersuchungen auf die Blätter konzentrieren kann, sollen im folgenden Abschnitt die morphologischen Unterschiede der Blätter näher untersucht werden. Dies wird auch für die Normierung der aus den Experimenten erhaltenen Daten wichtig sein.

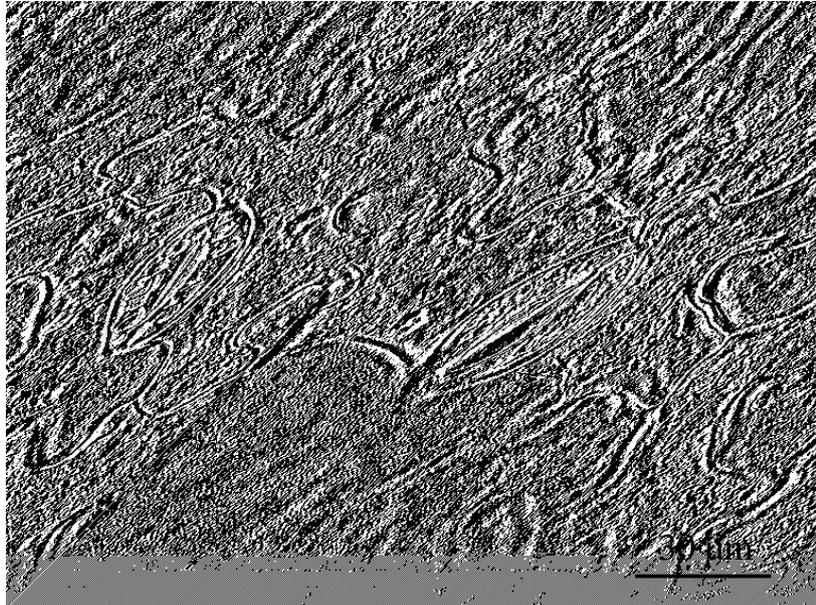
Während die Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen implizit auf die Anzahl der PS II-Reaktionszentren normiert sind, finden die Gasflußmessungen pro Blattfläche statt. Obwohl es in der Photosyntheseforschung Standard ist, Fluoreszenz- und Gasflußmessungen parallel durchzuführen, wird im folgenden Abschnitt genauer untersucht, ob Unterschiede in den Meßgrößen bei Nitrat- und Ammoniumernährung ausschließlich auf Unterschieden in der Beschaffenheit der Blätter und damit der Normierung basieren. Von Fryer et al. (1998) wurde vorgeschlagen, bei der Untersuchung unterschiedlicher Elektronenakzeptoren die Daten eher auf den Chlorophyllgehalt zu normieren als auf die Fläche, wenn die Pflanzen unter verschiedenen Streßbedingungen angezogen wurden.

Es gibt zwar bereits Untersuchungen über die unterschiedliche Morphologie von nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen (Raab und Terry, 1994; Walch-Liu et al., 2000), es ergaben sich aber widersprüchliche Ergebnisse, die von der verwendeten Stickstoffkonzentration, der Jahreszeit, dem Altersstadium der Pflanzen und anderen (teilweise noch unbekannt) Parametern abhängen. Aus diesem Grunde war es notwendig, die wichtigsten morphologischen Daten der hier verwendeten Pflanzen durch Messungen zu bestimmen.

### 6.1. Anzahl der Stomata und Zellen pro Blattfläche

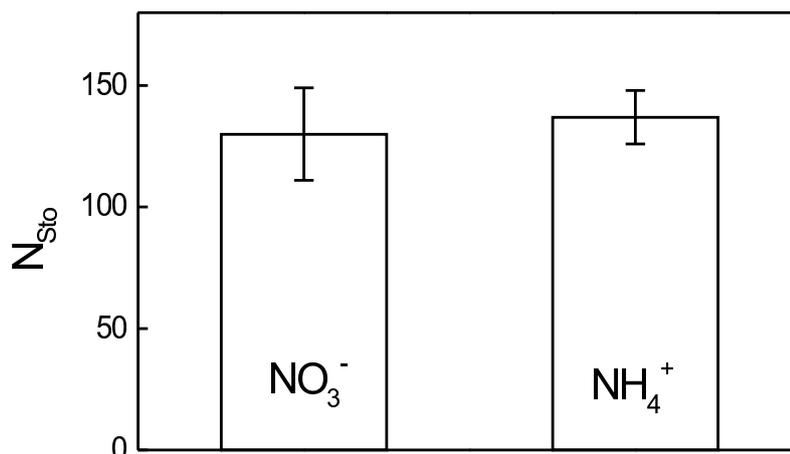
Der Gasaustausch findet über die Spaltöffnungen (Stomata) statt. Deshalb ist davon auszugehen, daß die Gasflußmessungen von  $O_2$  und  $CO_2$  auch von der Anzahl der Stomata pro Fläche abhängen sowie davon, ob sie eher geöffnet oder geschlossen sind. Die Stomata werden geschlossen, wenn in der Umgebung  $CO_2$ -Mangel oder Wassermangel herrscht. Im Allgemeinen muß ein Optimum erreicht werden zwischen Wasserverlust durch die Stomata (Transpiration) und der Möglichkeit zur  $CO_2$ -Aufnahme für die Photosynthese. Abbildung 6.1 zeigt eine geöffnete und eine geschlossene Spaltöffnung eines ammoniumernährten Boh-

nenblattes.



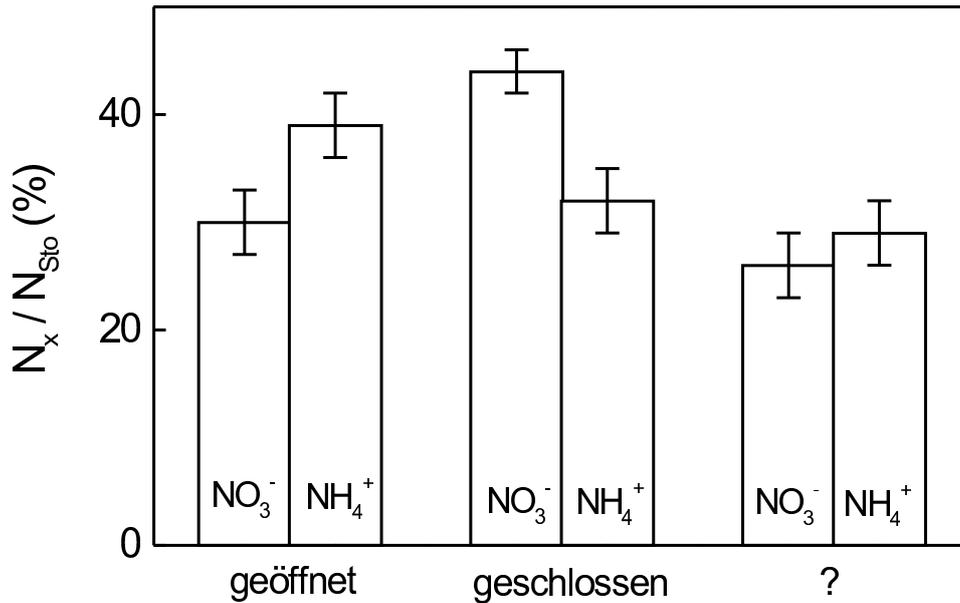
**Abbildung 6.1.:** Geöffnete (links) und geschlossene Spaltöffnung eines ammoniumernährten Bohnenblattes. Die Aufnahme wurde mit einem Mikroskop mit 400facher Vergrößerung angefertigt.

Für Aufnahmen wie diese wurde bei einem abgeschnittenen Blattstück die Epidermis abgezogen, das Blattstück zusammen mit einem Tropfen destillierten Wassers möglichst ohne Luftblasen zwischen 2 Glasplättchen gepresst und mit einem Mikroskop im Botanischen Institut der Universität Kiel (mit Unterstützung von Jon Falk, AG Krupinska) unter 400facher Vergrößerung betrachtet.



**Abbildung 6.2.:** Anzahl der Spaltöffnungen  $N_{Sto}$  (pro  $mm^2$ ) von nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern. Es ist der Mittelwert aus jeweils 14 Aufnahmen dargestellt.

Mit Aufnahmen wie der in Abbildung 6.1 dargestellten wurde mit einer Mikroskopeinstellung von 100facher und 200facher Vergrößerung die Anzahl der Stomata und Zellen pro Fläche ausgezählt. Es ergab sich kein Unterschied in der Anzahl der Stomata pro Fläche zwischen den beiden Stickstoffformen (Abbildung 6.2). Für eine Blattfläche von  $962 \text{ mm}^2$ , wie sie sich in der Meßkammer der Clark-Elektrode befindet, ergibt sich somit eine Stomata-Anzahl von  $125\,060 (\pm 18274)$  bei den nitraternährten Pflanzen sowie  $131\,794 (\pm 10582)$  bei den ammoniumernährten.

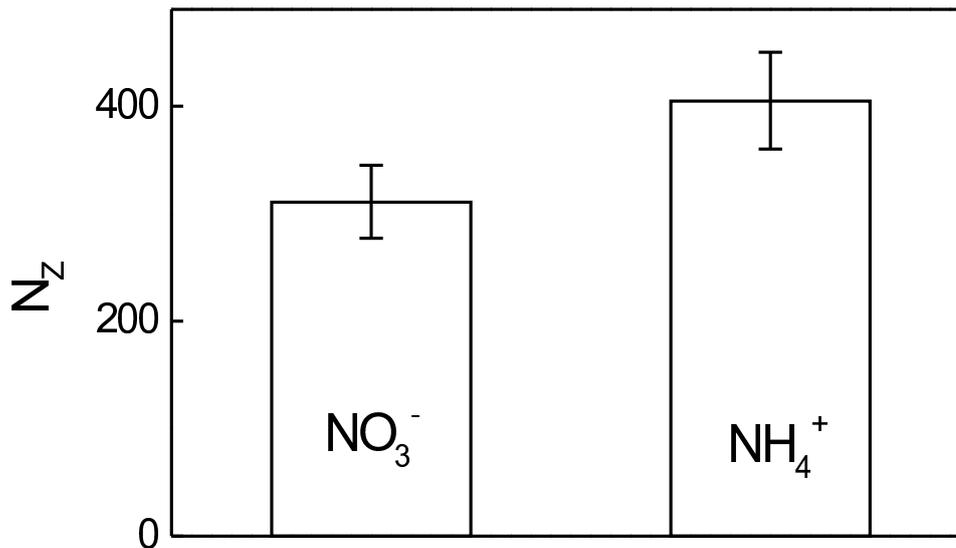


**Abbildung 6.3.:** Anteil der geöffneten, geschlossenen sowie nicht bestimmaren Spaltöffnungen ( $N_x/N_{Sto}$ ; x: geöffnet, geschlossen, nicht bestimmbar) von nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern. Es ist der Mittelwert aus jeweils 14 Aufnahmen dargestellt.

Ein anderes Bild ergibt sich, wenn eine Unterscheidung zwischen geöffneten und geschlossenen Spaltöffnungen gemacht wird (Abbildung 6.3). Obwohl für beide Stickstoffformen ca. 30% der Spaltöffnungen nicht eindeutig als geöffnet bzw. geschlossen identifiziert werden konnten, zeigt sich, daß die Spaltöffnungen der ammoniumernährten Blätter tendentiell eher geöffnet sind. Dies ist in Übereinstimmung mit den  $\text{CO}_2$ -Gasflußmessungen von Guo (2001), der eine höhere stomatare Leitfähigkeit  $g_s$  bei ammoniumernährten Blättern fand ( $g_s$ :  $0.2 (\text{NO}_3^-)$  und  $0.36 (\text{NH}_4^+)$   $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , siehe auch Kapitel 8.2).

Unterschiede zeigten sich auch in der Anzahl der Zellen pro Fläche (Abbildung 6.4). So besitzen die ammoniumernährten Pflanzen mehr, d.h. kleinere Zellen pro Fläche. Dies könnte eine Ursache für die tendentiell eher geöffneten Spaltöffnungen sein: Es müssen mehr Zellen durch die gleiche Anzahl von Spaltöffnungen mit  $\text{CO}_2$  versorgt werden.

Guo (2001) fand, daß die Blattfläche bei ammoniumernährten Pflanzen kleiner ist als bei nitraternährten. Dieses Ergebnis im Zusammenhang mit den kleineren Zellen läßt auf ei-



**Abbildung 6.4.:** Anzahl der Zellen  $N_Z$  (pro  $\text{mm}^2$ ) von nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern. Es ist der Mittelwert aus jeweils 14 Aufnahmen dargestellt.

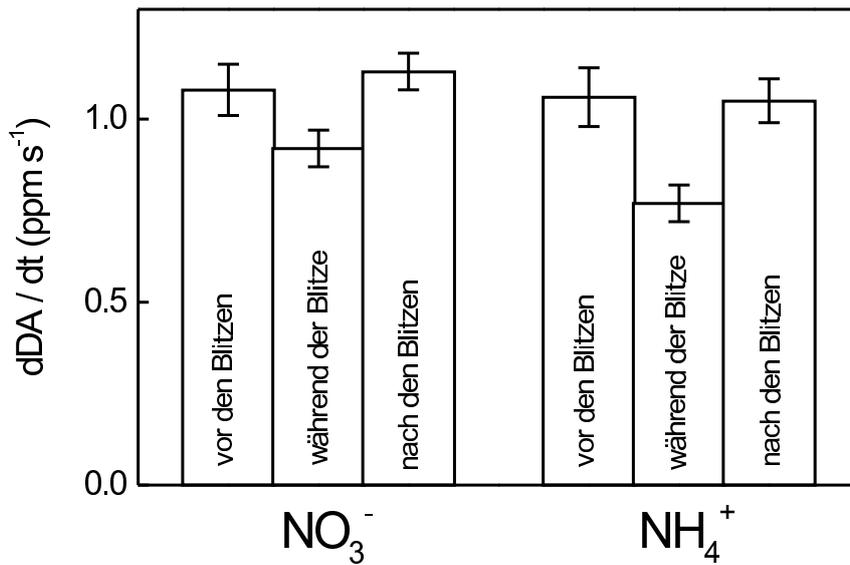
ne geringere Blattexpansion unter Ammoniumernährung schließen. Walch-Liu et al. (2000), die ähnliche Effekte beobachteten, stellten die Hypothese auf, daß  $\text{NO}_3^-$  (unabhängig von seiner Funktion als Stickstoff-Quelle) hormonell in eine Signalübertragungskette involviert sein könnte, die die Blattmorphologie regelt, indem sie die Blätter mit Cytokininen versorgt. Die Rolle des Nitrats als Signalstoff wurde auch beim Wurzelwachstum vermutet (Kapitel 5).

## 6.2. Anzahl der Reaktionszentren

Wie in Kapitel 2.2.1 bereits beschrieben, finden in den Reaktionszentren die lichtgetriebenen Ladungstrennungen statt. Die Fluoreszenzmessungen sind implizit auf die Anzahl der PS II-Reaktionszentren normiert. Gäbe es einen stickstoffspezifischen Unterschied in der Anzahl der PS II-Reaktionszentren pro Fläche, so müßte dies bei einem Vergleich der Fluoreszenzmessungen mit den Gasflußmessungen berücksichtigt werden.

Zur Bestimmung der Anzahl der Reaktionszentren wurde die Sauerstoffentwicklung als Antwort auf eine Abfolge von Single-Turnover-Blitzen mit der Clark-Elektrode gemessen (Verfahren beschrieben bei Dörner, 1999). Single-Turnover-Blitze sollen zwei Anforderungen genügen: Sie müssen sättigend sein, sollen aber pro Blitz nur zu genau einer Ladungstrennung führen. Dazu wurden mit Hilfe einer Xenonblitzlampe (FX 134, EG&G Electro Optics Inc., Wellesley, USA) Blitze mit einer Dauer im Mikrosekundenbereich erzeugt. Ein Rechteckgenerator liefert extern das TTL-Signal zum Triggern einzelner Blitze der Xe-Lampe.

In Abbildung 6.5 ist die Rate der Dunkelatmung vor den Blitzen, während der Blitze und



**Abbildung 6.5.:** Messung zur Bestimmung der Anzahl der Reaktionszentren von nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern. Es wurde die Rate der Dunkelatmung vor, während und nach den Blitzen bestimmt. Es ist der Mittelwert aus jeweils neun Messungen dargestellt.

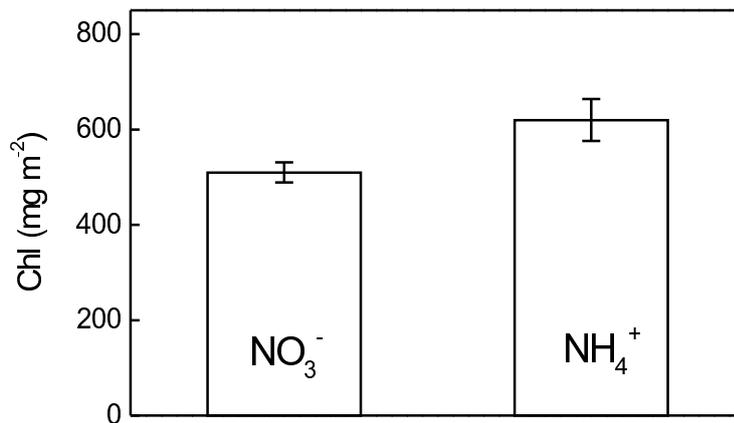
nach den Blitzen dargestellt. Es zeigt sich, daß es zu keiner Netto-Sauerstoffentwicklung während der Blitze kommt, sondern nur zu einer Verminderung der Rate der Dunkelatmung. Die Rate der Dunkelatmung nach den Blitzen sollte im Vergleich zur Rate vor den Blitzen nicht verändert sein, da keine Veränderung des photochemischen Gesamtapparates erwünscht ist. Dies ist bei den Messungen in Abbildung 6.5 auch nicht der Fall.

Es zeigt sich aber, daß bei Differenzbildung zwischen der Dunkelatmung vor den Blitzen und während der Blitze bei ammoniumernährten Blättern ein größerer Unterschied auftritt (Abbildung 6.5). Dies läßt im Einklang mit der größeren Zahl an Zellen pro Fläche eine größere Anzahl an Reaktionszentren pro Fläche vermuten. Durch die Differenzbildung ergeben sich allerdings große Fehler (RZ in Abbildung 6.8), so daß keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden kann, inwieweit diese Messung mit der Anzahl der Zellen korreliert.

### 6.3. Chlorophyllgehalt und Absorptionskoeffizient

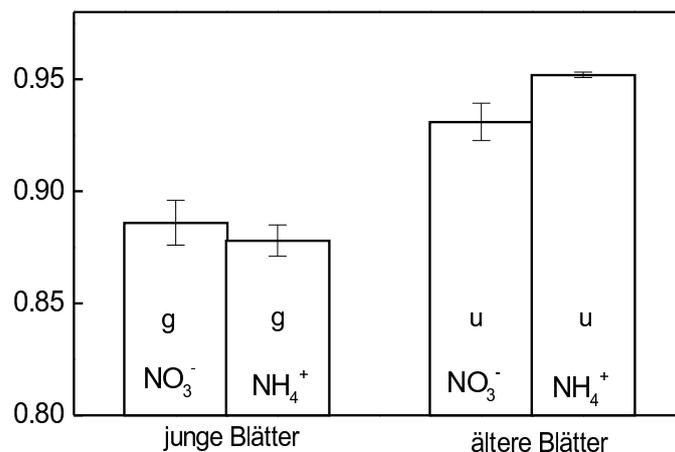
Der Chlorophyllgehalt ist eine charakteristische und relativ einfach zu bestimmende Größe, die in der Photosyntheseforschung häufig zu Normierungszwecken herangezogen wird. Der Chlorophyllgehalt der hier verwendeten nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen wurde von Guo (2001) nach der Methode von Arnon (1949) bestimmt (Abbildung 6.6). Wie bei den meisten anderen Meßgrößen zeigte sich auch hier ein größerer Anteil bei den ammoniumernährten Pflanzen.

Für die Berechnungen in Kapitel 8.3 ist die Kenntnis des Absorptionskoeffizienten ( $\alpha$ ) not-



**Abbildung 6.6.:** Chlorophyllgehalt (Chl) von nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern. Die Daten wurden der Arbeit von Guo (2001) entnommen.

wendig. Er wurde wie folgt bestimmt: Bei verschiedenen eingestrahnten Intensitäten (100, 200, 400, 800, 1200, 1600 und 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wurde die Intensität direkt hinter dem Blatt gemessen. Es ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Intensität vor dem Blatt



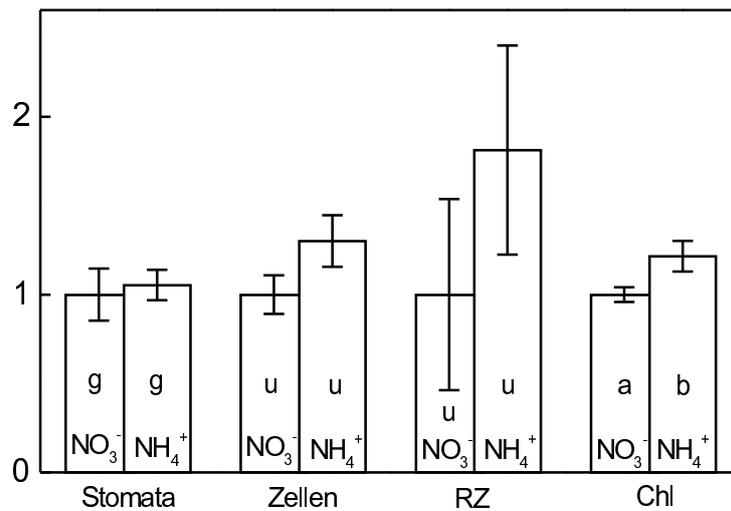
**Abbildung 6.7.:** Absorptionskoeffizient ( $\alpha$ ) von jungen und älteren nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern. Es ist der Mittelwert aus jeweils vier Messungen dargestellt. Mit dem Student-Newman-Keuls-Test (Kreyszig, 1988; Signifikanzzahl  $p=0.01$ ) wurde überprüft, ob die Ergebnisse signifikant unterschiedlich (u) oder gleich (g) sind.

und der Intensität hinter dem Blatt. Mit linearer Regression wurde daraus der Absorptionskoeffizient bei jungen und älteren Blättern bestimmt (Abbildung 6.7). In der Literatur wird meist mit einem Standardwert von 0.85 gerechnet. Aus Abbildung 6.7 ist ersichtlich, daß sich die Messungen an jungen Blättern durchaus in dieser Größenordnung bewegen. Mit Alterung des Blattes nimmt die Absorption allerdings zu und erreicht relativ untypische Werte. Evans (1999), der Untersuchungen der Absorption in Blättern in Abhängigkeit von der ein-

gestrahlten Wellenlänge und der Eindringtiefe des Lichts machte, fand allerdings bei einer Blattdicke über 300  $\mu\text{m}$  für blaues Licht Absorptionskoeffizienten, die größer als 0.9 waren. Unabhängig von den absoluten Werten zeigte sich, daß bei jungen Blättern ein stickstoffspezifischer Unterschied im Absorptionskoeffizienten nicht vorhanden war, während bei älteren Blättern der Absorptionskoeffizient bei Ammoniumernährung höher lag. Die anderen morphologischen Parameter wurden nur für ältere Blättern bestimmt, da die meisten Messungen in dieser Arbeit an älteren Blättern durchgeführt wurden. Hier waren im allgemeinen die stickstoffspezifischen Unterschiede stärker ausgeprägt.

### 6.4. Übersicht der Ergebnisse

In Abbildung 6.8 sind die wichtigsten der in den obigen Abschnitten besprochenen morphologischen Parameter in einer Übersicht dargestellt. Zum besseren Vergleich wurden die Werte der nitraternährten Pflanzen jeweils auf 1 normiert. Mit dem Student-Newman-Keuls-Test (Kreyszig, 1988; Signifikanzzahl  $p = 0.01$ ) wurde untersucht, ob die Originaldaten gleich oder signifikant verschieden sind.



**Abbildung 6.8.:** Übersicht der in den obigen Abschnitten besprochenen Ergebnisse. Für einen besseren Vergleich wurden die Meßergebnisse von nitraternährten Blättern jeweils auf 1 normiert. Es sind die Anzahl der Stomata pro  $\text{mm}^2$ , die Anzahl der Zellen pro  $\text{mm}^2$ , die Anzahl der Reaktionszentren (RZ) sowie der Chlorophyllgehalt (Chl) dargestellt. Mit dem Student-Newman-Keuls-Test ( $p = 0.01$ ) wurde überprüft, ob die Originaldaten signifikant unterschiedlich (u) oder gleich (g) sind. Die Chl-Daten wurden der Arbeit von Guo (2001) entnommen und dort als signifikant unterschiedlich (a), (b) bewertet.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Anzahl der Zellen pro Fläche und der Chlorophyllgehalt einen ähnlichen Quotienten zwischen Nitrat- und Ammoniumernährung bil-

den. Wegen der großen Fehlerbalken, die sich bei der Bestimmung der Reaktionszentren (RZ) aus der Differenzbildung ergeben, kann keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden, ob ihre Menge mit der Zellanzahl und dem Chlorophyllgehalt korreliert. Für die Anzahl der Stomata wurden keine stickstoffspezifischen Unterschiede gefunden. Außerdem zeichnete sich bei der Bestimmung des Absorptionskoeffizienten ab, daß sich die Eigenschaften der Blätter während ihres Wachstums verändern und die stickstoffspezifischen Unterschiede bei älteren Blättern ausgeprägter sind.

## 7. Adaption des Photosyntheseapparates an Schwachlicht- und Starklichtbedingungen

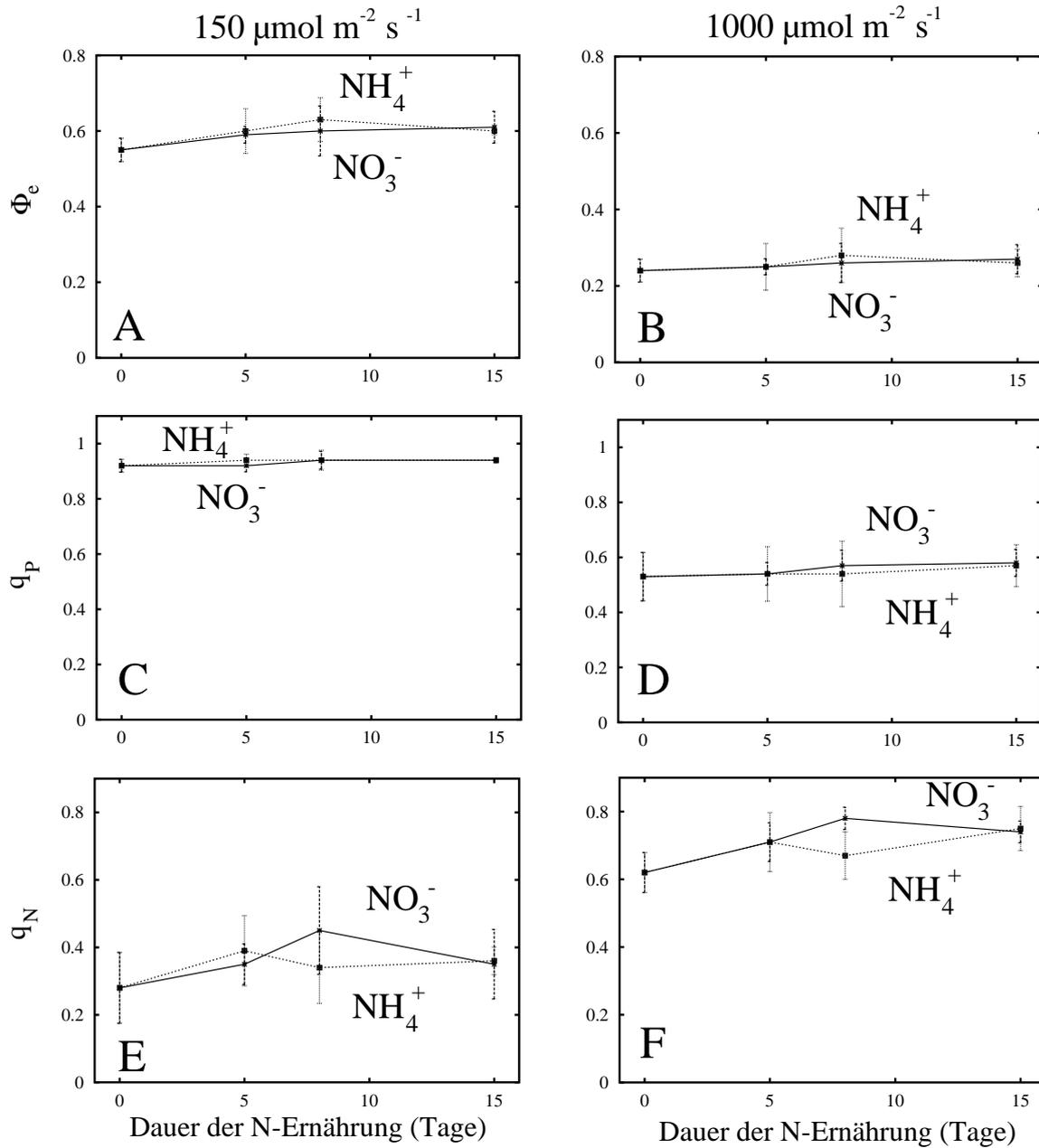
Die in Kapitel 4 beschriebene Aussage, daß trotz verminderten Zeaxanthingehalts kein Unterschied in der Photoinhibition bei nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen gefunden wurde, entstammt aus Messungen unter stets gleichen Bedingungen. Ob diese Aussage erhalten bleibt, wenn Parameter geändert werden, soll hier überprüft werden, indem die Zeit des Stresses variiert wird.

Aus diesem Grund wurden bei Pflanzen, die unter Schwachlicht (LL,  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Starklicht (HL,  $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen wurden, die Fluoreszenz-Quenching-Prozesse sowie das Absorptionssignal bei  $\lambda = 505 \text{ nm}$  bestimmt. Die Proben wurden direkt vor Beginn der unterschiedlichen Stickstoff- und Lichtbehandlung sowie fünf, acht und 15 Tage nach Beginn der jeweiligen Stickstoff- und Lichtbehandlung genommen.

Die beiden Lichtintensitäten wurden gewählt, um in Abhängigkeit von der jeweiligen Stickstoffernährung die Adaption an unterschiedliche Lichtbedingungen zu untersuchen. Bei Schwachlichtpflanzen handelt sich um Pflanzen, deren Photosyntheseapparat nicht auf Lichtstreß vorbereitet ist. Bei der Untersuchung des Verhaltens von Starklichtpflanzen stellt sich die Frage, ob sie Mechanismen zur Bewältigung des Lichtstresses entwickelt haben oder ob sie bereits stärker geschädigt sind.

### 7.1. Fluoreszenzmessungen an Schwachlichtpflanzen

Die Fluoreszenzparameter  $\Phi_e$ ,  $q_p$  und  $q_N$  der nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen, die unter Schwachlicht angezogen wurden, sind in Abbildung 7.1 dargestellt. Die Blätter wurden unmittelbar vor der Messung von den jeweiligen Pflanzen abgetrennt. Mit dem PAM (Kapitel 3.2.4.1) wurde nach 20 minütiger Dunkeladaption und nach Messung der minimalen und maximalen Fluoreszenz ( $F_0$  und  $F_M$ , Kapitel 3.2.4.3) mit Aktinlichtintensitäten von  $150$  und  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  die variable Fluoreszenz  $F$  bestimmt. Zur Messung der maximalen Fluoreszenz im helladaptierten Zustand  $F'_M$  wurden alle  $10 \text{ s}$  sättigende Blitze zugegeben. Aus den so aufgenommenen Fluoreszenzkurven wurden jeweils drei Werte unter Steady-State-Bedingungen ausgesucht, aus denen für eine Messung der Genty-Parameter



**Abbildung 7.1.:** Einfluß der Dauer der Stickstoff- und Lichtbehandlung auf Genty-Parameter ( $\Phi_e$ ), photochemisches Quenching ( $q_p$ ) und nichtphotochemisches Quenching ( $q_n$ ) von nitrat- und ammoniumernährten Buschbohnen, die unter Schwachlichtbedingungen angezogen wurden. Die PAM-Messungen wurden mit  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (A, C, E) und  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (B, D, F) Aktinlichtintensität durchgeführt. Es ist der Mittelwert aus vier Messungen dargestellt.

$\Phi_e$  (Genty et al., 1989; Gleichungen 3.3 und A.23), das photochemische Quenching  $q_p$  (Gleichung 3.1) sowie das nicht-photochemische Quenching  $q_N$  (Gleichung 3.2) für die jeweilige Aktinlichtintensität berechnet wurden. Das PAM wurde für diese Messungen gewählt, um

einen optimalen Vergleich für die bei Zhu et al. (2000) dargestellten Messungen zu bekommen. Diese wurden von Bendixen mit dem PAM durchgeführt.

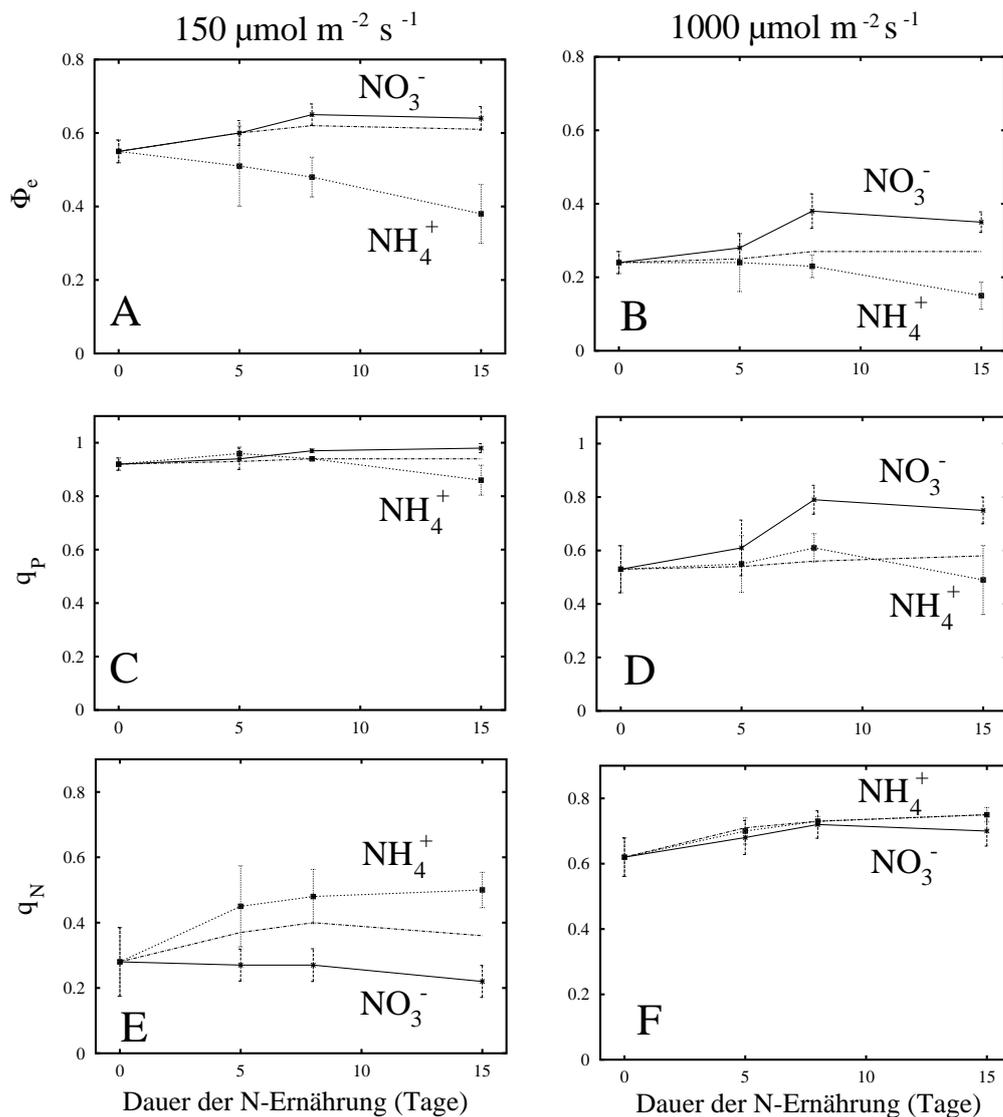
Es ist für den gesamten Zeitraum der Behandlung kein stickstoffspezifischer Unterschied in den Fluoreszenz-Parametern zu beobachten (Abbildung 7.1 A, B, C, D). Lediglich im nicht-photochemischen Quenching zeigt sich am achten Tag der Stickstoff- und Lichtbehandlung eine leichte Erhöhung bei den nitraternährten Pflanzen sowie eine leichte Abnahme bei den ammoniumernährten Pflanzen (Abbildung 7.1 E, F). Dieser Verlauf ist wahrscheinlich auf das Verhalten der Abwehrenzyme zurückzuführen: In den ersten Tagen der Stickstoff- und Lichtbehandlung wächst der durch die Behandlung ausgelöste Schaden, was sich im oben beschriebenen Effekt auf das nichtphotochemische Quenching äußert. Ungefähr ab dem siebten Tag werden die Enzyme eingeschaltet. Durch die Wirkung der eingeschalteten Enzyme ist am 15. Tag der Effekt auf das nichtphotochemische Quenching wieder verschwunden. Bendixen fand bei seinen Messungen ebenfalls keinen stickstoffspezifischen Unterschied im photochemischen Quenching (Zhu et al., 2000). Beim Energy-Quenching ergab sich jedoch eine Erhöhung bei den nitraternährten Pflanzen, die bei den hier gezeigten Messungen nicht beobachtet wurde. Allerdings geht aus den Messungen von Bendixen nicht hervor, zu welchem Zeitpunkt der Stickstoff- und Lichtbehandlung sie durchgeführt wurden. Falls sie ungefähr um den achten Tag der Behandlung stattgefunden hätten, könnte sich eine Übereinstimmung mit den hier gezeigten Daten (Abbildung 7.1 E, F) ergeben.

## 7.2. Fluoreszenzmessungen an Starklichtpflanzen

Anders verhalten sich die Fluoreszenzparameter der nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen, die unter Starklichtbedingungen angezogen wurden (Abbildung 7.2).  $\Phi_e$ ,  $q_p$  und  $q_N$  wurden nach demselben Meßprotokoll bestimmt wie die Fluoreszenzparameter der Schwachlichtpflanzen.

Bei der Aktinlichtintensität von  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  zeigt sich bei den nitraternährten Pflanzen kein Effekt der Starklichtanzucht im Genty-Parameter  $\Phi_e$  und im photochemischen Quenching  $q_p$ , während bei den ammoniumernährten Pflanzen eine Abnahme zu beobachten ist (Abbildung 7.2 A, C). Beim nicht-photochemischen Quenching  $q_N$  (Abbildung 7.2 E) wirkt sich die Starklichtanzucht bei den nitraternährten Pflanzen in Form einer Abnahme, bei den ammoniumernährten Pflanzen in einer Stimulation aus.

Bei der Aktinlichtintensität von  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ist bei den nitraternährten Pflanzen eine Stimulation von  $\Phi_e$  und  $q_p$  zu beobachten (Abbildung 7.2 B, D), während bei den ammoniumernährten Pflanzen ein Rückgang von  $\Phi_e$  (Abbildung 7.2 B) bzw. kein Effekt auf  $q_p$  auftritt (Abbildung 7.2 D). Weder bei Nitrat- noch bei Ammoniumernährung ist eine Wirkung der Starklichtanzucht auf das nicht-photochemische Quenching  $q_N$  zu sehen (Abbildung 7.2 F).



**Abbildung 7.2.:** Einfluß der Dauer der Stickstoff- und Lichtbehandlung auf Genty-Parameter ( $\Phi_e$ ), photochemisches Quenching ( $q_p$ ) und nichtphotochemisches Quenching ( $q_n$ ) von nitrat- und ammoniumernährten Buschbohnen, die unter Starklichtbedingungen angezogen wurden. Die PAM-Messungen wurden mit  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (A, C, E) und  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (B, D, F) Aktinlichtintensität durchgeführt. Auf der Abszisse ist die Dauer der jeweiligen Stickstoffbehandlung aufgetragen. Zusätzlich ist der jeweilige Mittelwert aus den Messungen an den Schwachlichtpflanzen aus Abbildung 7.1 als gestrichelte Linie abgebildet.

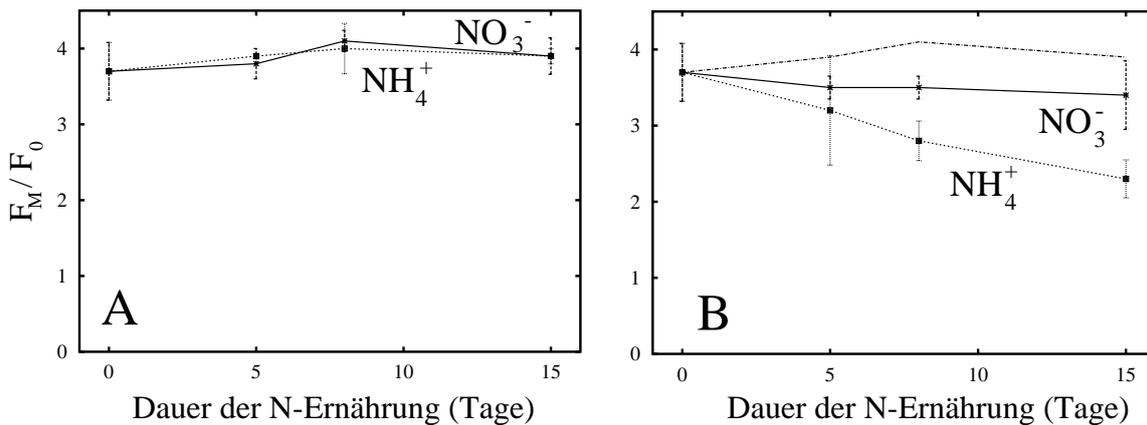
Dies kann aber auch an dem in Kapitel 3.2.4.4 beschriebenen Skalierungsproblem liegen: Bei hohen Flüssen, wie sie in Abbildung 7.2C und F auftreten, wird die Empfindlichkeit der variablen Fluoreszenz als Maß für ein zusätzliches Anwachsen in den Flüssen sehr gering. Dadurch kann eine Zunahme der Flüsse unterschätzt werden. Unter diesen Bedingungen hätte die FC-Maschine wahrscheinlich detailliertere Ergebnisse geliefert.

Bei den Messungen von Bendixen bei einer Aktinlichtintensität von  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  zeigte sich ein höheres photochemisches Quenching  $q_p$  bei den nitraternährten Pflanzen, das bei den hier dargestellten Messungen erst nach 15 Tagen der Behandlung auftritt (Abbildung 7.2 C). Außerdem fand er ein (nicht signifikantes) höheres Energy-Quenching bei nitraternährten Pflanzen, das im Gegensatz zum hier gezeigten höheren nicht-photochemischen Quenching bei ammoniumernährten Pflanzen steht (Abbildung 7.2 E).

Bei der hohen Aktinlichtintensität zeigten sich bei Bendixen weder Unterschiede im photochemischen noch im Energy-Quenching. Es ergibt sich für das nicht-photochemische Quenching eine Übereinstimmung mit den hier dargestellten Daten (Abbildung 7.2 F). Im Gegensatz zu Bendixen wurde allerdings ein höheres photochemischen Quenching in nitraternährten Pflanzen gefunden (Abbildung 7.2 D).

Es zeigt sich, daß es notwendig ist, das Zeitverhalten der Quenching-Parameter in Abhängigkeit der Dauer der Stickstoff- und Lichtbehandlung zu untersuchen.

### 7.3. Photoinhibitions-Quenching

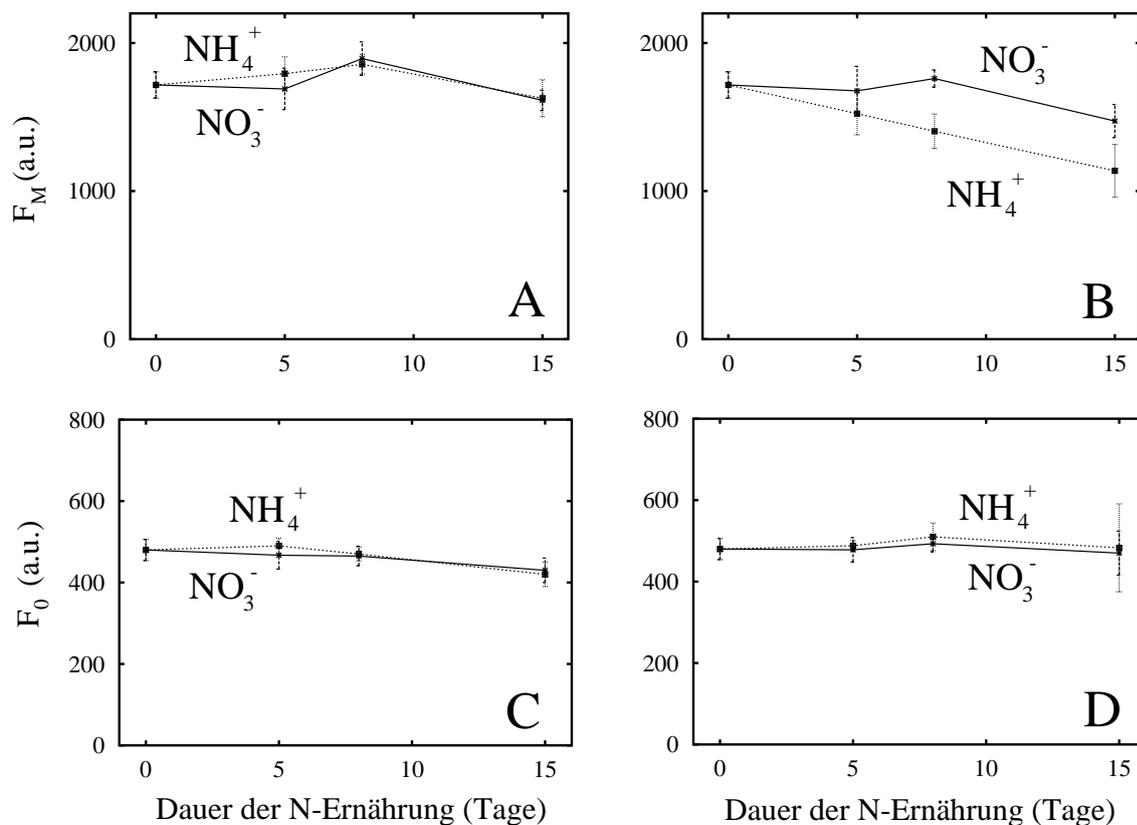


**Abbildung 7.3.:** Das Verhältnis von maximaler zu minimaler Fluoreszenz ( $F_M/F_0$ ) von nitrat- und ammoniumernährten Buschbohnen, die unter Schwachlicht- (A) und Starklichtbedingungen (B) angezogen wurden. Auf der Abszisse ist die Dauer der jeweiligen Stickstoff- und Lichtbehandlung aufgetragen. Es ist der Mittelwert aus vier Messungen dargestellt. Zusätzlich ist in (B) der Mittelwert aus (A) als gestrichelte Linie abgebildet.

Ein sensibler Parameter, um Streßerscheinungen im photosynthetischen Apparat aufzuzeigen, ist der Quotient aus maximaler und minimaler Fluoreszenz nach Dunkeladaption  $F_M/F_0$  (Abbildung 7.3). Während bei Schwachlichtanzucht weder ein stickstoffspezifischer Unterschied noch eine Abnahme während des Behandlungszeitraums zu beobachten ist (Abbildung 7.3 A), ist bei Starklichtanzucht eine Abnahme in beiden Stickstoffformen zu sehen (Abbildung 7.3 B). Allerdings ist der Rückgang von  $F_M/F_0$  in den ammoniumernährten

Pflanzen stärker ausgeprägt als in den nitraternährten Pflanzen.

Anhand der beiden Größen  $F_M$  und  $F_0$  läßt sich eine Unterscheidung der beiden nicht-photochemischen Quenchingmechanismen (Energy Quenching und Photoinhibitionsquenching) vornehmen. Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, können die beiden Mechanismen meßtechnisch durch ihr Zeitverhalten unterschieden werden: Das Energy Quenching relaxiert im Sekundenbereich, das Photoinhibitionsquenching bleibt über Stunden bestehen. Da der Wert  $F_M$  nach Dunkeladaption bestimmt wurde, ist davon auszugehen, daß Energy Quenching keine Rolle spielt. Änderungen in  $F_M$  sind dann auf Photoinhibitionsquenching zurückzuführen.



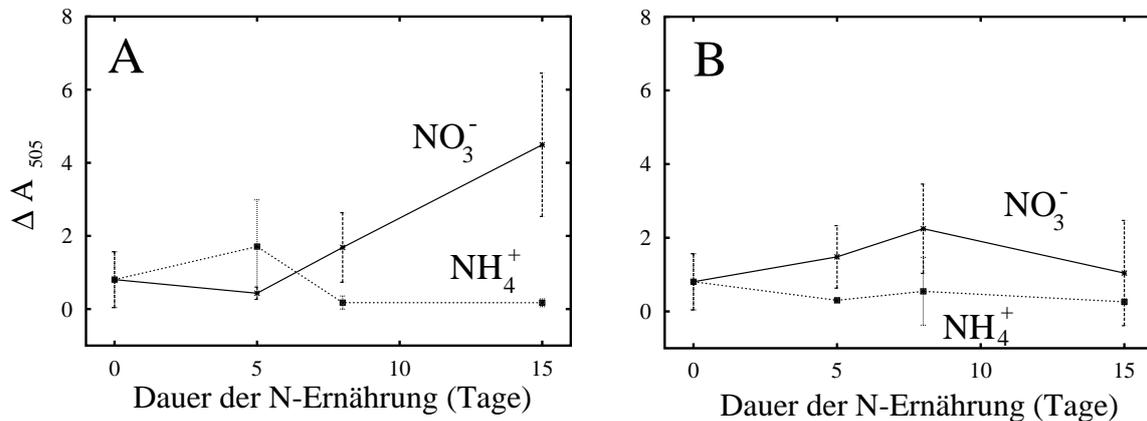
**Abbildung 7.4.:** Maximale ( $F_M$ ; A, B) und minimale ( $F_0$ ; C, D) Fluoreszenz von nitrat- und ammoniumernährten Buschbohnen, die unter Schwachlicht- (A, C) und Starklichtbedingungen (B, D) angezogen wurden. Der Wert von  $F_0$  wurde vor Beginn des gesamten Lichtprogramms bestimmt. Auf der Abszisse ist die Dauer der jeweiligen Stickstoff- und Lichtbehandlung aufgetragen. Es ist der Mittelwert aus vier Messungen dargestellt.

In Abbildung 7.4 sind die maximale ( $F_M$ ; A, B) und minimale ( $F_0$ ; C, D) Fluoreszenz dargestellt. Stickstoffspezifische Unterschiede ergaben sich für  $F_M$  bei den unter Starklicht angezogenen Pflanzen (Abbildung 7.4B). Da dies ein Indikator für Photoinhibition ist, zeigt sich, daß diese bei ammoniumernährten Pflanzen stärker ausgeprägt ist, bei nitraternährten

Pflanzen aber auch auftritt. Dies steht im Gegensatz zu den Messungen von Bendixen (1998), der bei beiden Lichtbehandlungen keine stickstoffspezifischen Unterschiede gefunden hat.

#### 7.4. Absorptionsmessungen bei $\lambda = 505 \text{ nm}$

Zusätzliche Information über den Zustand von PS II geben die Absorptionsmessungen bei  $\lambda = 505 \text{ nm}$ . Dazu wurden die abgeschnittenen Blätter nach den Fluoreszenzmessungen über Nacht dunkeladaptiert. Nach Bendixen (1998) stellt dies sicher, daß der Violaxanthinpool (Abbildung 4.1) zu Beginn der Messung seine maximale Größe aufweist. Mit dem in Kapitel 3.4 beschriebenen Meßaufbau wurden die Absorptionsänderungen als Reaktion auf aktinisches Licht von  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aufgenommen (Abbildung 7.5). Diese Lichtintensität wurde von Bendixen (1998) als optimale Aktinlichtintensität für die verwendeten Buschbohnen bestimmt.



**Abbildung 7.5.:** Absorptionsänderungen als Reaktion auf Aktinlicht von  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  an nitrat- und ammoniumernährten Buschbohnen, die unter Schwachlicht- (A) und Starklichtbedingungen (B) angezogen wurden. Auf der Abszisse ist die Dauer der jeweiligen Stickstoff- und Lichtbehandlung aufgetragen. Es ist der Mittelwert aus vier Messungen dargestellt.

Die Pflanzen unter Schwachlichtanzucht (Abbildung 7.5 A) zeigen die bereits von Bendixen (1998) beschriebene höhere Zeaxanthinantwort pro Chlorophyll in nitraternährten Pflanzen. Allerdings entwickelt sich ein höherer Violaxanthinpool erst mit Dauer der Licht- und Nitratbehandlung.

Unter Starklichtanzucht treten schwächere Unterschiede im Absorptionssignal zwischen Nitrat- und Ammoniumernährung auf (Abbildung 7.5 B). Es ist jedoch die Zeaxanthinantwort in nitraternährten Pflanzen während des gesamten Meßzeitraums höher als in ammoniumernährten Pflanzen. Dies ist ein Hinweis darauf, daß auch die nitraternährten Pflanzen durch die Anzucht unter Starklicht beeinträchtigt sind, was sich sowohl in einer Abnahme der Zeaxanthinantwort als auch der maximalen Fluoreszenz  $F_M$  (Abbildung 7.4 B) äußert.

Allerdings ist diese Schwächung nicht so stark ausgeprägt wie bei den ammoniumernährten Pflanzen, die mit einer Beeinträchtigung der ETC auf Starklichtanzucht reagieren (Abbildung 7.2 A, B, C, D). Eine interessante Beobachtung ist allerdings, daß trotz der geringen Zeaxanthin-Bildung bei ammoniumernährten Starklichtpflanzen (Abbildung 7.5 B) ein erhöhtes nichtphotochemisches Quenching bei einer Aktinlichtintensität von  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  auftritt (Abbildung 7.2 E). Eine mögliche Erklärung dafür ist das Auftreten von Energy-Quenching ohne die Bildung von Zeaxanthin. Für den Ort und die Entstehung des Energy-Quenching gibt es unterschiedliche Hypothesen. Während Horton und Ruban (1993) die Antennen für den Entstehungsort des Energy-Quenching hielten, gingen Weis und Berry (1987) davon aus, daß es in den Reaktionszentren auftritt. Neuere Veröffentlichungen (Bruce et al., 1997) vermuten nicht mehr das gesamte Energy-Quenching in den Reaktionszentren, aber zumindest den Teil davon, der die Zeaxanthin-unabhängige Komponente des Energy-Quenching darstellt (Adams et al., 1990).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß schon unter Schwachlichtanzucht stickstoffspezifische Unterschiede in den Schutzmechanismen ausgeprägt sind, was sich im unterschiedlichen Zeaxanthinsignal äußert (Abbildung 7.5 A). Diese unterschiedlichen Schutzmechanismen zeigen sich allerdings nicht in den Fluoreszenzparametern (Abbildungen 7.1 und 7.3 A). Dies deutet (auch im Zusammenhang mit den in Kapitel 4 diskutierten Messungen) darauf hin, daß die Ursachen für die unterschiedliche Lichtresistenz nicht in PS II zu suchen sind, sondern in den metabolischen Prozessen, die für eine Abnahme der Reduktionsäquivalente aus den Chloroplasten sorgen.

## 8. Vergleich von Gas- und Elektronenflüssen

Die im vorangegangenen Kapitel besprochenen Ergebnisse führten auf die Erkenntnis, daß Redoxexport aus den Chloroplasten eine zentrale Rolle spielt. Eine Arbeitshypothese des Stickstoff-Projekts war die Vermutung, daß die ammoniumernährten Pflanzen mehr als die nitraternährten die Photorespiration nutzen, um unter Starklicht überschüssige Reduktionsäquivalente aus den Chloroplasten zu exportieren. Die  $H_2O_2$ -Entwicklung in den Peroxisomen (Abbildung 2.4) könnte dann Ursache für die Probleme der ammoniumernährten Pflanzen sein. Aus diesem Grund sollte mittels  $CO_2$ -Gasflußmessungen im Rahmen der Dissertation von Guo (2001) der Anteil der Photorespiration in den nitrat- und ammoniumernährten Bohnenpflanzen nach dem klassischen Modell von Brooks und Farquhar (1985) untersucht werden.

### 8.1. Das Brooks-Farquhar-Modell

Das Modell basiert darauf, daß der Quotient aus Carboxylierung und Oxygenierung ( $V_C/V_O$ ) aus der Kinetik der Rubisco sowie der Kenntnis der Partialdrücke von  $CO_2$  und  $O_2$  am Ort der Carboxylierung/Oxygenierung ermittelt werden kann:

$$\frac{V_C}{V_O} = S \frac{[CO_2]}{[O_2]} \quad (8.1)$$

wobei  $S$  die Substratspezifität der Rubisco ist. Diese ist meßtechnisch allerdings schwer zu erfassen. Daher wird der  $CO_2$ -Partialdruck  $\Gamma^*$  bestimmt, bei dem die  $CO_2$ -Aufnahme durch die Carboxylierung und die  $CO_2$ -Abgabe durch die Photorespiration gleich sind ( $V_C = 0.5 V_O$ ). Der Faktor 0.5 ergibt sich aus der Tatsache, daß im Glycolat-Weg 0.5  $CO_2$  pro  $O_2$  (das mit RuBP reagiert) freigesetzt werden (Abbildungen 2.4 und 8.1 A).

$$\Gamma^* = \frac{0.5 [O_2]}{S} \quad (8.2)$$

Wenn der Partialdruck  $[O_2]$  bekannt ist, kann mit Hilfe von  $\Gamma^*$  die Substratspezifität berechnet werden.

$\Gamma^*$  wird meßtechnisch als diejenige  $CO_2$ -Konzentration bestimmt, bei der die  $CO_2$ -Assimilation  $A$  gegenüber Änderungen von  $V_C$ , die durch Änderungen in der Lichtintensität verursacht werden, invariant ist. Dies geschieht unter folgenden Voraussetzungen:

- Die Substratspezifität  $S$  variiert nicht mit der Lichtintensität.
- Die Lichtatmung  $R_d$  ist invariant gegenüber der Lichtintensität. Die Lichtatmung ist als diejenige  $\text{CO}_2$ -Abgabe definiert, die aus anderen Prozessen als der Photorespiration resultiert. Hier kommt hauptsächlich die  $\text{CO}_2$ -Abgabe durch die Mitochondrien in Frage. Sie wird von der Dunkelatmung  $R_n$  unterschieden, die die  $\text{CO}_2$ -Abgabe durch die Mitochondrien im Dunkeln darstellt.

In der Arbeit von Guo (2001) konnte keine eindeutige Aussage über den Anteil der Photorespiration in nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen gemacht werden, da es bereits bei der Bestimmung von  $\Gamma^*$  stickstoffspezifische Unterschiede gab. Diese Unterschiede dürften innerhalb einer Pflanzensorte eigentlich nicht auftreten, da die Selektivität der Rubisco in genetisch identischen Pflanzen gleich sein sollte.

Daher wird in den folgenden Abschnitten diskutiert, welche Prozesse zu einem unterschiedlichen  $\Gamma^*$  führen können und ob die Untersuchung der Abhängigkeit der  $\text{CO}_2$ -Aufnahme ( $A$ ) von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration und der Lichtintensität zu einer Bestimmung der zugrundeliegenden Gas- und Elektronenflüsse führen kann.

Die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme  $A$  setzt sich im klassischen Brooks-Farquhar-Modell aus folgenden Komponenten zusammen:

$$A = V_C - 0.5 V_O - R_d \quad (8.3)$$

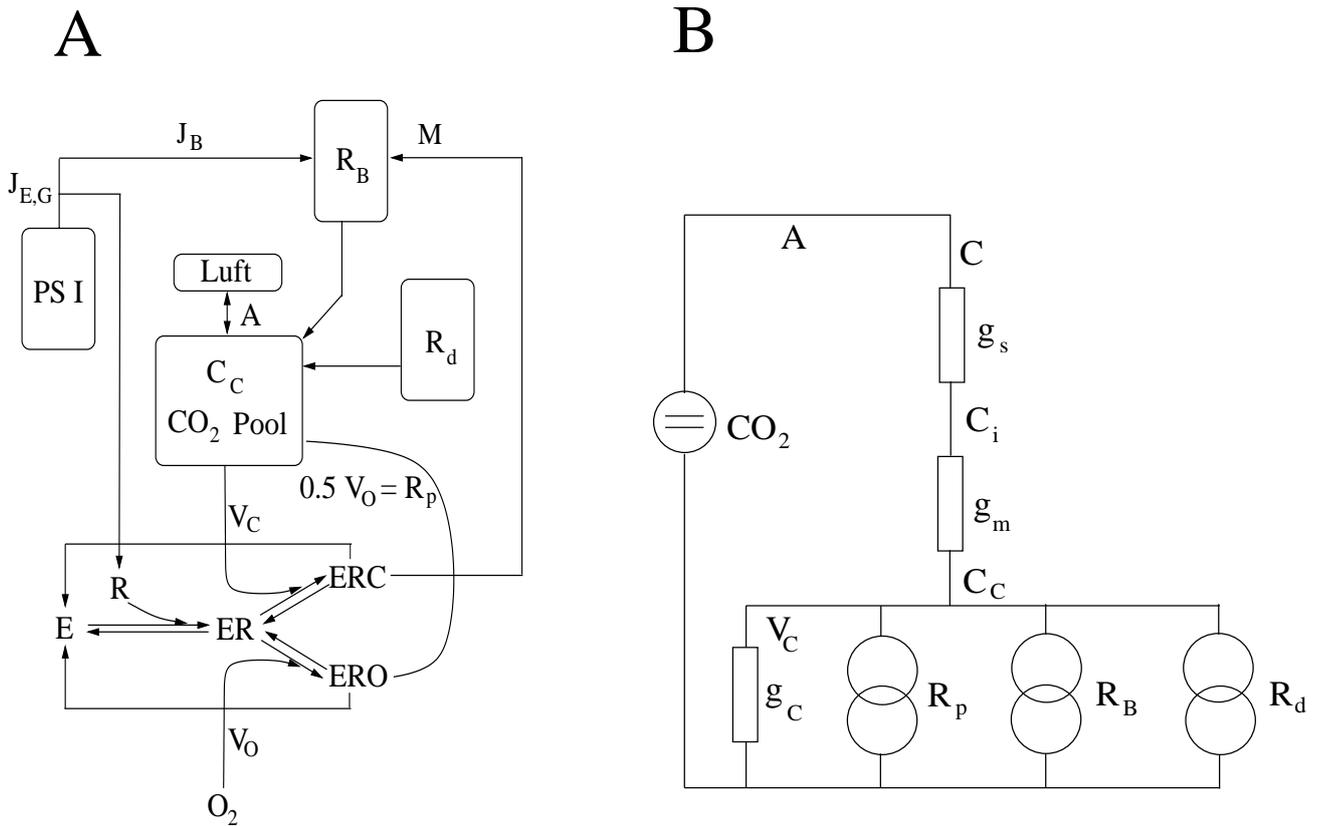
Formel 8.3 bedeutet, daß die  $\text{CO}_2$ -Aufnahme  $A$  durch die Carboxylierung  $V_C$  erfolgt. Vermindert werden kann diese Aufnahme durch  $\text{CO}_2$ -Flüsse, die durch die Photorespiration freigesetzt werden ( $0.5 V_O$ , Abbildungen 2.4 und 8.1 A), und durch  $\text{CO}_2$ -Flüsse aus der Lichtatmung  $R_d$ .

In Abbildung 8.1 A ist dieses klassische Modell erweitert durch eine lichtabhängige Komponente  $R_B$ , die ebenfalls  $\text{CO}_2$ -Flüsse liefert und deren Bedeutung in den folgenden Abschnitten näher untersucht werden soll.

Als Grundlage für die Rechnungen dient das Ersatzschaltbild in Abbildung 8.1 B. Die  $\text{CO}_2$ -Flußmessungen, die mit dem Licor (Licor-6400 IRGA) durchgeführt werden, können die  $\text{CO}_2$ -Assimilation  $A$  sowie die dazugehörigen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen  $C_i$  im interzellulären Gasraum messen. Nicht gemessen werden kann die  $\text{CO}_2$ -Konzentration  $C_C$  im Chloroplasten am Ort der Carboxylierung/Oxygenierung.

## 8.2. Unterschiede in $\Gamma^*$ bei Nitrat- und Ammoniumernährung

In den folgenden Abschnitten wird mit Hilfe unterschiedlicher Hypothesen untersucht, warum bei nitraternährten Pflanzen das gemessene  $\Gamma^*$  höher lag als bei ammoniumernährten (Guo, 2001). Unter der Annahme, daß die Selektivität der Rubisco in genetisch identischen Pflanzen gleich sein sollte, könnte dieser Unterschied auf drei verschiedene Ursachen zurückzuführen sein.



**Abbildung 8.1.:** (A) Flüsse von Reduktionsäquivalenten und Gasen in einem Blatt. (B) Ersatzschaltbild der CO<sub>2</sub>-Flüsse im Blatt. Die Flüsse sind:  $J_{E,G}$  = Elektronenfluß, der aus den Gasflüssen berechnet wird,  $J_B$  = Fluß von Reduktionsäquivalenten, die nicht zum Calvin-Zyklus fließen,  $R_B$  = die damit verbundene CO<sub>2</sub>-Entwicklung,  $R_p$  = CO<sub>2</sub>-Fluß aus der Photorespiration,  $R_d$  = CO<sub>2</sub>-Fluß aus der Lichtatmung,  $V_C$  = CO<sub>2</sub>-Fluß aus der Carboxylierung,  $V_0$  = O<sub>2</sub>-Fluß aus der Oxygenierung,  $A$  = gemessene CO<sub>2</sub>-Aufnahme.  $g_s$  steht für stomatare,  $g_m$  für Mesophyll- und  $g_C$  für Calvin-Zyklus-Leitfähigkeit für CO<sub>2</sub>.  $C$  bezeichnet die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Luft,  $C_i$  die CO<sub>2</sub>-Konzentration im interzellulären Gasraum und  $C_C$  die vermutete CO<sub>2</sub>-Konzentration in den Chloroplasten.  $E$  = Das Enzym Rubisco,  $R$  = RuBP,  $M$  = CO<sub>2</sub>-Entwicklung von Metaboliten.

## Hypothese 1

Hypothese 1 geht von der Annahme aus, daß es **keine lichtstimulierte Atmung  $R_B$**  gibt. Dann kann der Unterschied in  $\Gamma^*$  aus zwei verschiedenen Ursachen resultieren, die beide ihre Grundlage in Gleichung

$$\Gamma_m^* = \Gamma_r^* - R_d \frac{1}{g_m} \quad (8.4)$$

haben.

Gleichung 8.4 läßt sich mit Hilfe von Abbildung 8.1 erklären: Das reale  $\Gamma_r^*$  ist  $C_C$  unter der Bedingung, daß der CO<sub>2</sub>-Ausstrom aus der Photorespiration ( $R_p$ ) den CO<sub>2</sub>-Verbrauch durch

die Carboxylierung ausgleicht, d.h.  $R_p = 0.5 \cdot V_O = V_C = C_C \cdot g_C$ . In beiden Pflanzenarten soll  $\Gamma_r^*$  gleich sein. Das gemessene  $\Gamma_m^*$  ist  $C_i$  unter der Bedingung, daß der photorespiratorische Fluß  $R_p$  den Fluß  $V_C$  ausgleicht. Das Minuszeichen resultiert aus der Tatsache, daß  $\Gamma_r^*$  größer sein muß als  $\Gamma_m^*$ , um  $R_d$  zu erzeugen, den  $\text{CO}_2$ -Ausstrom aufgrund der Lichtatmung.

### Hypothese 1A:

Es wird angenommen, daß  **$g_m$  in beiden Pflanzenarten gleich ist**. Weiterhin sei die unterschiedliche Lichtatmung  $R_d$  zusammen mit einem endlichen  $g_m$  ausreichend, um den Unterschied von  $\Gamma_m^*$  in nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen zu erklären.

Werden die gemessenen Werte  $\Gamma_m^*$  und  $R_d$  (für nitrat- und ammoniumernährte Pflanzen, Tabelle 8.1 A) in Gleichung 8.4 eingesetzt, lassen sich daraus die beiden unbekannt Parameter  $\Gamma_r^*$  und  $g_m$  berechnen.

In Tabelle 8.1 B sind die gemeinsamen, nach Gleichung 8.4 berechneten Werte von  $\Gamma_r^*$  und  $g_m$  dargestellt.

Es stellt sich jedoch die Frage, wie sinnvoll diese Werte sind. Der Wert von  $\Gamma_r^*$  ist ähnlich den gemessenen Werten  $\Gamma_m^*$ . Die Mesophyll-Leitfähigkeit  $g_m = 0.046 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  muß mit den gemessenen Werten der stomatären Leitfähigkeit  $g_s$  von 0.2 ( $\text{NO}_3^-$ ) und 0.36 ( $\text{NH}_4^+$ )  $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  verglichen werden.  $g_m$  ist zwar kleiner, aber die Diffusion vom interzellulären Gasraum durch die Spaltöffnungen sollte einfacher sein als durch das Gewebe vom interzellulären Gasraum zum Wirkungsort des Calvin-Zyklus.

Das Hauptargument gegen obige Hypothese kommt jedoch aus der Überlegung, daß der Wert von  $g_m$  groß genug sein muß, um die maximalen  $\text{CO}_2$ -Flüsse unter hohen Lichtintensitäten zu erlauben. Tabelle 8.1 A zeigt die maximale  $\text{CO}_2$ -Assimilation ( $A_{max}$ ), die dazugehörige interzelluläre  $\text{CO}_2$ -Konzentration  $C_i$ ,  $\Gamma_m^*$  und  $R_d$ , die von Guo (2001) an nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen gemessen wurden. Die Berechnung von  $C_C$  aus

$$C_C = C_i - \frac{A}{g_m} \quad (8.5)$$

ergibt, daß  $C_C$  für den maximalen Fluß  $A_{max}$  (Tabelle 8.1 A) negative Werte von -73 ppm bzw. -91 ppm (letzte Spalte in Tabelle 8.1 B) erreichen kann.

Dies zeigt, daß der gemessene Unterschied in  $\Gamma_m^*$  nicht allein durch ernährungsspezifische Unterschiede in der Lichtatmung  $R_d$  erklärt werden kann. Als nächste Hypothese werden daher Unterschiede in  $g_m$  in Betracht gezogen.

### Hypothese 1B:

Es wird angenommen, daß **die Mesophyll-Leitfähigkeit  $g_m$  unterschiedlich ist** in nitrater-nährten (Index 3) und ammoniumernährten (Index 4) Pflanzen.

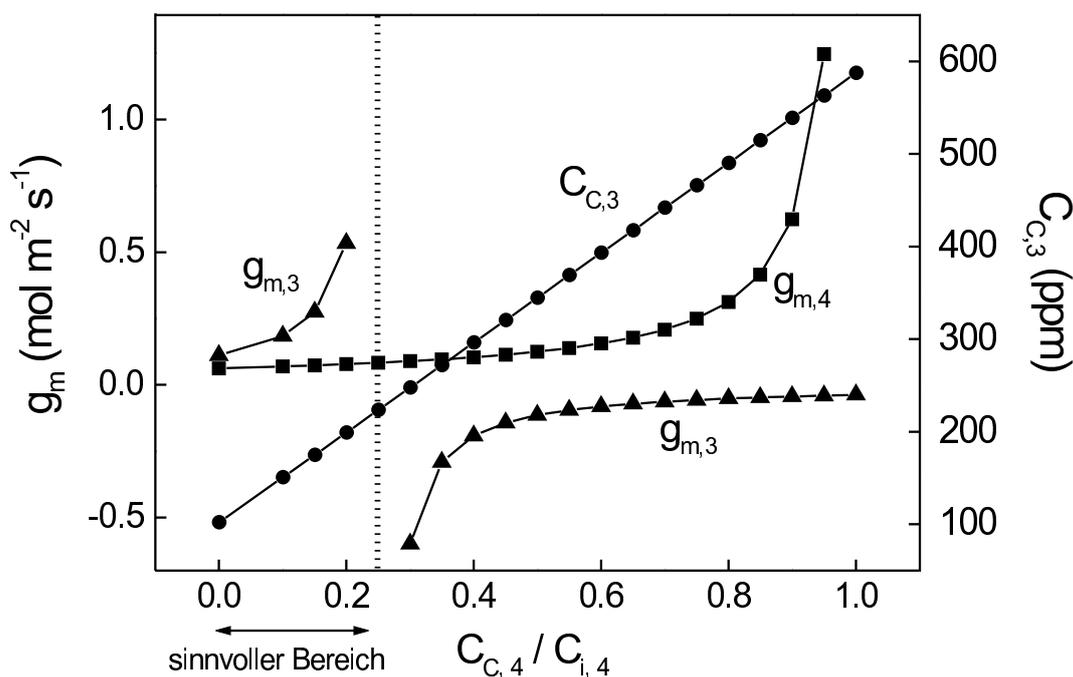
$$\Delta \Gamma_m^* = \Gamma_{m,3}^* - \Gamma_{m,4}^* = R_{d,4} \frac{1}{g_{m,4}} - R_{d,3} \frac{1}{g_{m,3}} \quad (8.6)$$

<b>A</b>	$A_{max}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$C_i$ (ppm)	$\Gamma_m^*$ (ppm)	$R_d$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
$\text{NO}_3^-$	$13.7 \pm 1.0$	$225 \pm 7$	$34.8 \pm 2.9$	$0.24 \pm 0.08$
$\text{NH}_4^+$	$15.9 \pm 0.8$	$255 \pm 8$	$28.4 \pm 2.9$	$0.53 \pm 0.17$
<b>B</b> Hypothese 1A	$\Gamma_r^*$ (ppm)	$g_m$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$C_C$ (ppm)	
$\text{NO}_3^-$	40.1	0.046	-73	
$\text{NH}_4^+$	40.1	0.046	-91	
<b>C</b> Hypothese 1B	$g_{m,3} \rightarrow \infty$	$C_C (\text{NO}_3^-) = 0$	$C_C (\text{NO}_3^-) = 0.5 C_i$	$C_C (\text{NH}_4^+) = 0$
$g_{m,3}$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	$\infty$	0.061	0.122	0.109
$g_{m,4}$ ( $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	0.084	0.052	0.064	0.062
$g_{m,3}/g_{m,4}$		1.17	1.91	1.76
$C_{C,3}$ (ppm)	225	0	113	99
$C_{C,4}$ (ppm)	66	-51	7	0
<b>D</b> Hypothese 2	$\Gamma_r^* + R_{B,4}/g_c$ (ppm)	$\Delta R_B/g_C$ (ppm)	$\Delta R_B$ in % $V_C$ unter $\Gamma^*$ -Beding.	
	28.4	6.35	22.4	

**Tabelle 8.1.:** Auf der Grundlage der Hypothesen 1A, 1B oder 2 berechnete Werte unter Verwendung der gemessenen Daten in (A) (Guo, 2001). In (B) sind die Werte von  $\Gamma_r^*$  und  $g_m$  dargestellt, die unter Hypothese 1A mit Hilfe von Gleichung 8.4 berechnet wurden. Die in der 4. Spalte abgebildeten  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen im Chloroplasten ( $C_C$ ) wurden aus den maximalen  $\text{CO}_2$ -Flüssen A (in A) unter Verwendung von Gleichung 8.5 berechnet. (C) zeigt einige typische Parameterkombinationen aus Abbildung 8.2. Diese wurden unter der Bedingung berechnet, daß die korrekte Wahl von  $g_m$  den gemessenen Unterschied in  $\Gamma_m^*$  bewirkt. In (D) sind die mutmaßlichen Flüsse dargestellt, die sich durch die Einführung von weiteren Elektronenakzeptoren (neben dem Calvin-Zyklus) ergeben (Hypothese 2).

Da es nur eine Gleichung für zwei unbekannte Parameter ( $g_{m,3}$  und  $g_{m,4}$ ) gibt, wird in Abhängigkeit vom Parameter  $C_{C,4}/C_{i,4}$  der Bereich sinnvoller Werte gesucht. Wiederum wurde getestet, ob die maximalen  $\text{CO}_2$ -Flüsse durch das  $g_m$  fließen können, das benötigt wird, um den Unterschied in  $\Gamma_m^*$  zu erklären. D.h. die daraus resultierenden Werte der  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Chloroplasten ( $C_C$ ) dürfen nicht negativ werden.

Auf der Abszisse in Abbildung 8.2 sind die möglichen Werte des Verhältnisses  $C_{C,4}/C_{i,4}$  aufgetragen. Aus diesen Werten und  $A_{max,4}$  wurde mit Formel 8.5 der untere Grenzwert der Mesophyll-Leitfähigkeit in ammoniumernährten Pflanzen  $g_{m,4}$  berechnet (Quadrate in Abbildung 8.2). Dieser Wert von  $g_{m,4}$  wird benutzt, um mit Gleichung 8.6 die Mesophyll-



**Abbildung 8.2.:** Abhängigkeit der Parameter  $C_{C,3}$ ,  $g_{m,3}$  und  $g_{m,4}$  vom Verhältnis  $C_{C,4}/C_{i,4}$  berechnet nach Hypothese 1B unter Verwendung der Gleichungen 8.5 und 8.6 für  $\Delta\Gamma_m^*$  (Tabelle 8.1 A).

Leitfähigkeit  $g_{m,3}$  für nitraternährte Pflanzen zu berechnen (Dreiecke in Abbildung 8.2). Zusätzlich ist die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Chloroplasten  $C_{C,3} = C_{i,3} - A_{max,3}/g_{m,3}$  dargestellt (Kreise in Abbildung 8.2). Abbildung 8.2 zeigt, daß der beobachtete Unterschied in  $\Gamma_m^*$  ( $\Delta\Gamma_m^*$ ) im Bereich von  $C_{C,4}/C_{i,4} = 0$  bis 25% erreicht werden kann. Nur in diesem Bereich ergeben sich sinnvolle Werte. Bei höheren Werten von  $C_{C,4}/C_{i,4}$  wird die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Chloroplasten ( $C_{C,3}$ ) höher als die atmosphärische  $\text{CO}_2$ -Konzentration. Dies wird durch die negativen Werte der Mesophyll-Leitfähigkeit  $g_{m,3}$  verursacht. Jedoch auch im sinnvollen Bereich ist in nitraternährten Pflanzen die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Chloroplasten ( $C_{C,3}$ ) ziemlich hoch. Verglichen mit dem gemessenen Wert von  $C_{i,3}$  (Tabelle 8.1 A) nimmt sie einen Anteil von 45 bis 100% des  $C_{i,3}$  an.

Die Schlußfolgerung, die aus Abbildung 8.2 gezogen werden kann, beinhaltet, daß auch Hypothese 1B ziemlich unwahrscheinlich ist. Die Rubisco in ammoniumernährten Pflanzen müßte eine viel höhere Turnover-Rate haben als die in nitraternährten Pflanzen. Auf der rechten Seite des sinnvollen Bereichs in Abbildung 8.2 (bei  $C_{C,4}/C_{i,4} = 0.2$ ) erreichen die ammoniumernährten Pflanzen dieselbe Turnover-Rate ( $A_{max}$ ) bei  $C_{C,4} = 40$  ppm (berechnet mit dem gemessenen  $C_{i,4}$  aus Tabelle 8.1 A) wie die nitraternährten bei  $C_{C,3} = 200$  ppm. Auf der linken Seite des sinnvollen Bereichs in Abbildung 8.2 ist der Unterschied noch eindrucksvoller: In ammoniumernährten Pflanzen gibt eine  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Chloroplasten von  $C_{C,4} = 0$  dieselben maximalen  $\text{CO}_2$ -Flüsse ( $A_{max}$ ) wie in nitraternährten Pflanzen eine  $\text{CO}_2$ -

Konzentration  $C_{C,3}$  von 100 ppm.

### Hypothese 2:

Es wird angenommen, daß **es einen weiteren Elektronenakzeptor neben dem Calvin-Zyklus gibt, der  $\text{CO}_2$  produziert**, z.B. die Mitochondrien, die mit Reduktionsäquivalenten aus den Chloroplasten versorgt werden (Backhausen, 1994; Krömer, 1995; Noctor und Foyer, 1998). Um die Einflüsse verschiedener Effekte differenzieren zu können, wird  $g_m$  als unendlich angenommen. Dies bedeutet, daß die  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen im Chloroplasten und im interzellulären Gasraum gleich sind ( $C_C = C_i$ ) und die Lichtatmung  $R_d$  daher  $\Gamma_r^*$  nicht beeinflussen kann.

Unter der Bedingung, daß  $A = -R_d$ , ist  $C_C$  gleich  $\Gamma_r^*$ . Aus Abbildung 8.1 B lassen sich folgende Gleichungen ableiten. Das reale  $\Gamma_r^*$ , das ausschließlich aus der Selektivität der Rubisco resultiert, lautet für  $R_B = 0$

$$\Gamma_r^* g_C = 0.5V_O \quad (8.7)$$

Das gemessene  $\Gamma_m^*$  beinhaltet  $R_B \neq 0$

$$\Gamma_m^* g_C = 0.5V_O + R_B \quad (8.8)$$

Die Gleichungen 8.7 und 8.8 ergeben folgende Beziehung zwischen  $\Gamma_r^*$  und  $\Gamma_m^*$

$$\Gamma_m^* = \Gamma_r^* + \frac{R_{B,4}}{g_C} + \frac{\Delta R_B}{g_C} \quad (8.9)$$

wobei  $\Gamma_r^*$  gleich für nitrat- und ammoniumernährte Pflanzen ist sowie  $\Delta R_B/g_C = 0$  für ammoniumernährte Pflanzen und  $\Delta R_B/g_C = R_{B,3}/g_C - R_{B,4}/g_C$  für nitraternährte Pflanzen.

Da es nur zwei Gleichungen (eine für  $\text{NO}_3^-$  und eine für  $\text{NH}_4^+$ ) gibt, können nur zwei Parameter aus Gleichung 8.9 berechnet werden, nämlich

$$\Gamma_{m,4}^* = \Gamma_r^* + \frac{R_{B,4}}{g_C} \quad (8.10)$$

und

$$\frac{\Delta R_B}{g_C} = \Gamma_{m,3}^* - \Gamma_{m,4}^* \quad (8.11)$$

Nach den in Tabelle 8.1 D dargestellten Werten ist die lichtabhängige  $\text{CO}_2$ -Entwicklung  $R_B$  in nitraternährten Pflanzen höher. Die Zunahme von  $\Gamma_m^*$  mit zunehmendem  $R_B$  schließt die Notwendigkeit aus, ein von der Stickstoffform abhängiges  $g_m$  anzunehmen, da das gemessene  $\Gamma_m^*$  laut Gleichung 8.8 auch bei konstantem  $g_m$  mit  $R_B$  anwächst.

Der Unterschied  $\Delta R_B/g_C$  kann mit  $\Gamma_r^* = V_C/g_C$  verglichen werden. Er ergibt sich, daß  $\Delta R_B$  unter  $\Gamma_r^*$ -Bedingungen 22% von  $V_C$  ausmacht (Tabelle 8.1 D).

### 8.3. Vergleich des photosynthetischen Elektronenflusses $J_E$ berechnet aus der $\text{CO}_2$ -Aufnahme und der Chlorophyll-Fluoreszenz

Die unbekannt GröÙe in den obigen Überlegungen ist die Mesophyll-Leitfähigkeit  $g_m$  bzw. die daraus resultierende  $\text{CO}_2$ -Konzentration  $C_C$ . Die photosynthetische Aktivität des Calvin-Zyklus hängt von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Chloroplasten ( $C_C$ ) ab. Daher wird im folgenden untersucht, ob ein Vergleich der Gasflüsse und der über die Chlorophyll-Fluoreszenz gemessenen photosynthetischen Elektronenflüsse (Loreto et al., 1994) Aufschluß über das Verhalten von  $C_C$  geben kann.

Für diese Messungen wurde der PAM-Meßaufbau in das Gewächshaus des Instituts für Pflanzenernährung und Bodenkunde gebracht, um für die Fluoreszenz- und Gasmessungen gleiche Rahmenbedingungen zu haben. Die gesamte Pflanze (nitrat- oder ammoniumernährte Buschbohne) wurde für 15 min dunkeladaptiert. Nach Bestimmung der minimalen ( $F_0$ ) und maximalen ( $F_M$ ) Fluoreszenz wurde das vorher ausgewählte Blatt für jeweils 5 min aktinischem Licht von 50, 200, 350, 500, 950 bzw.  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ausgesetzt. Zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenz ( $F'_M$ ) während Beleuchtung mit aktinischem Licht wurden alle 10s sättigende Blitze zugegeben. Aus den so aufgenommenen Fluoreszenzkurven wurden jeweils drei Werte unter Steady-State-Bedingungen ausgesucht, aus denen für eine Messung der Genty-Parameter  $\Phi_e$  (Genty et al., 1989, sowie Gleichungen 3.3 und A.23) für die jeweilige Aktinlichtintensität berechnet wurde. An denselben Blättern wurden von Guo die Gasflußmessungen mit dem Licor durchgeführt. Er bestimmte die  $\text{CO}_2$ -Assimilation  $A$  und die zugehörige interzelluläre  $\text{CO}_2$ -Konzentration  $C_i$  in Abhängigkeit von den gleichen Lichtintensitäten, die für die Fluoreszenzmessungen verwendet wurden.

Der Elektronenfluß  $J_E$  aus den Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Genty-Parameters  $\Phi_e$  mit

$$J_{E,F} = 0.5 \cdot \Phi_e \cdot I \cdot \alpha \quad (8.12)$$

berechnet, wobei  $I$  die Lichtintensität ist. Die Nomenklatur  $J_{E,F}$  bedeutet, daß  $J_E$  aus der Chlorophyll-Fluoreszenz berechnet wurde, im Gegensatz zu  $J_{E,G}$ , das aus den Gasflüssen abgeleitet wird. Der Faktor 0.5 in Gleichung 8.12 beinhaltet, daß das Licht von zwei Photosystemen in Serie, PS II und PS I, absorbiert wird. Der Absorptionskoeffizient  $\alpha$  wurde nach der in Kapitel 6.3 beschriebenen Methode bestimmt und nahm dabei für die hier verwendeten älteren Blätter die Werte 0.93 ( $\text{NO}_3^-$ ) und 0.95 ( $\text{NH}_4^+$ ) an.

Der aus den Gasflußmessungen abgeleitete Elektronenfluß für den Calvin-Zyklus kann nach Abbildung 8.1 wie folgt berechnet werden.

$$J_{E,G} = 4 (V_C + V_O) = 4 \cdot g_c (C_C + 2\Gamma_r^*) \quad (8.13)$$

mit

$$\Gamma_r^* g_c = 0.5 V_O \quad (8.14)$$

Die Elimination von  $g_C$  mit

$$A = V_C - 0.5 V_O - R_d = g_C (C_C - \Gamma_r^*) - R_d \quad (8.15)$$

ergibt

$$J_{E,G} = \frac{4(C_C + 2\Gamma_r^*)}{(C_C - \Gamma_r^*)} (A + R_d) \quad (8.16)$$

$4 V_C$  und  $4 V_O$  in Gleichung 8.13 sind diejenigen Elektronenflüsse, die nötig sind, um die Menge NADPH/H<sup>+</sup> zu erzeugen, die für die Bindung des CO<sub>2</sub>-Flusses  $V_C$  bzw. des O<sub>2</sub>-Flusses  $V_O$  gebraucht wird. Dabei wird außer Acht gelassen, daß vier Elektronen nicht genug ATP für die CO<sub>2</sub>-Fixierung erzeugen können, besonders dann, wenn die Stöchiometrie der Protonenpumpe  $4 H^+ / ATP$  beträgt (Abbildung 2.2, Rumberg et al., 1990). Die zusätzlichen Elektronen für den Fluß  $J_B$  zweigen vom Hauptweg zu NADPH/H<sup>+</sup> ab (Abbildung 8.1). Sie könnten dafür benutzt werden, zusätzliches ATP zu liefern, z.B. für die N-Fixierung in nitraternährten Pflanzen. Werden diese zusätzlichen, hypothetischen Flüsse in Formel 8.16 eingefügt, so ergibt sich:

$$J_{E,G} = \frac{4(A + R_d + R_B)(C_C + 2\Gamma_r^*)}{(C_C - \Gamma_r^*)} + J_B \quad (8.17)$$

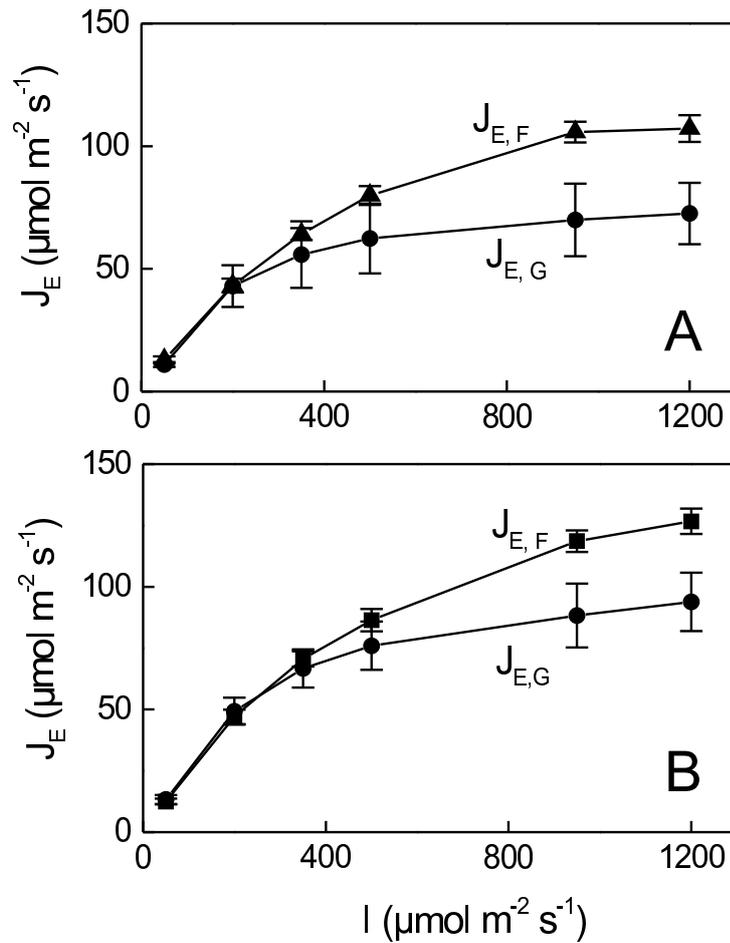
Gleichung 8.17 ist unter der Bedingung  $R_B = J_B = 0$  identisch zu Formel A8 bei von Caemmerer und Farquhar (1981) unter RuBP Limitation. Daher wurde in erster Näherung  $J_{E,G}$  nach Gleichung 8.17 berechnet unter der Bedingung, daß  $R_B = J_B = 0$ , und mit  $J_{E,F}$  (Gleichung 8.12) verglichen. Die Formeln 8.16 und 8.17 beinhalten außerdem, daß die Mesophyll-Leitfähigkeit  $g_m$  (Abbildung 8.1 B) unendlich ist ( $C_C = C_i$ ).

Sowohl bei den nitraternährten als auch bei den ammoniumernährten Pflanzen lagen die Flüsse, die über die Chlorophyll-Fluoreszenz bestimmt wurden, bei hohen Lichtintensitäten höher als die mit Hilfe der Gasmessungen bestimmten Flüsse (Abbildung 8.3). Dieser Effekt kann zwei Ursachen haben: (A) Eine endliche Mesophyll-Leitfähigkeit  $g_m$ , die  $C_C$  verringert, oder (B) Elektronenflüsse, die nicht zum Calvin-Zyklus fließen, was sich in einer Zunahme von  $J_B$  und  $R_B$  bemerkbar macht.

Wird der Effekt eines endlichen  $g_m$  miteinbezogen, muß  $C_C$  durch Gleichung 8.5 ersetzt werden. Dabei ergibt sich aus Gleichung 8.17 die allgemeinste Beziehung für den Fluß  $J_{E,G}$

$$J_{E,G} = \frac{4(A + R_d + R_B)(C_i - \frac{A}{g_m} + 2\Gamma_r^*)}{(C_i - \frac{A}{g_m} - \Gamma_r^*)} + J_B \quad (8.18)$$

Im folgenden wurden Kurvenfits angewandt, um herauszufinden, ob durch Gleichung 8.18 mit einer geeigneten Anzahl von freien Parametern eine Koinzidenz von  $J_{E,F}$  und  $J_{E,G}$  erreichen werden kann. Das Problem dabei ist, daß die Abhängigkeit von  $R_B$  und  $J_B$  von der



**Abbildung 8.3.:** Vergleich von  $J_{E,F}$  berechnet über die Chlorophyll-Fluoreszenz (Gleichung 8.12) und  $J_{E,G}$  berechnet aus der  $\text{CO}_2$ -Aufnahme (Gleichung 8.17) unter der Annahme, daß  $\text{NADPH}/\text{H}^+$  der einzige Elektronenakzeptor von PS I ist ( $J_B = R_B = 0$ ) und die Mesophyll-Leitfähigkeit  $g_m$  unendlich ist (Gleichung 8.5). In (A) sind die Werte der nitraternährten Pflanzen, in (B) die Werte der ammoniumernährten Pflanzen dargestellt.  $C_C = C_i$  wurde mit dem Licor bestimmt (Messungen von Shiwei Guo, Institut für Pflanzenernährung),  $\Gamma^*$  wurde Tabelle 8.1 A entnommen ( $\text{NH}_4^+$ ). Es sind jeweils die Mittelwerte aus vier Messungen dargestellt.

Lichtintensität völlig unbekannt ist. Aus diesem Grund wurde getestet, ob der Unterschied zwischen  $J_{E,F}$  und  $J_{E,G}$  in Abbildung 8.3 schon dadurch minimiert werden kann, wenn  $R_B = J_B = 0$  gesetzt und durch den Kurvenfit ein geeignetes  $g_m$  gefunden wird. Dies führt auf folgende, reduzierte Form von Gleichung 8.18

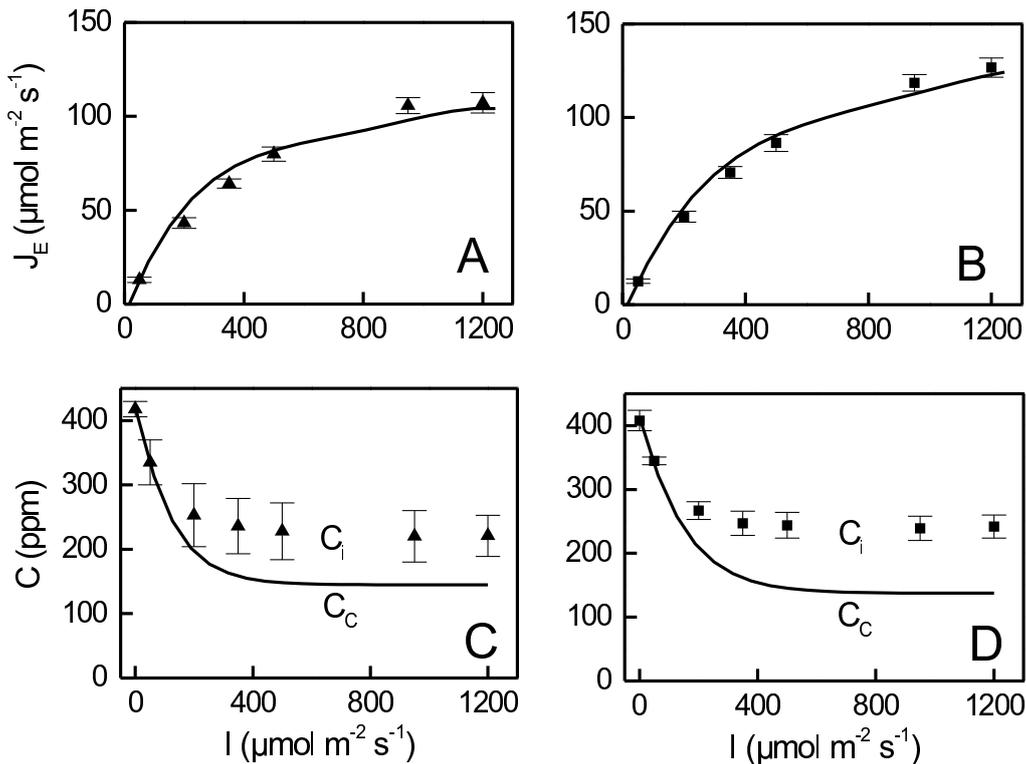
$$J_{E,F} = a_1 4 A Q + a_2 4 Q \quad (8.19)$$

mit

$$Q = \frac{C_i - \frac{A}{g_m} + 2\Gamma^*}{C_i - \frac{A}{g_m} - \Gamma^*} \quad (8.20)$$

Falls  $R_B$  eine ähnliche Lichtabhängigkeit besitzt wie A, ist es möglich,  $R_B$  über  $a_1$  zu erfassen. Über  $a_2$  kann durch den Fit die Lichtatmung  $R_d$  abgeschätzt werden.

Für die Fits wurde die Kombination aus einer Gausschen linearen Regression (für die  $a_i$ ) und einem Simplex-Algorithmus (für  $\Gamma_r^*$  und  $g_m$ , Press et al., 1986) benutzt. Allerdings enthielt sogar die reduzierte Form von Gleichung 8.18 noch zu viele Freiheitsgrade. Aus diesem Grund wurde ein  $\Gamma_r^*$  von 30 ppm in der Fitroutine vorgegeben. Zusätzlich wurde ein Joint Fit (Globalfit) angewandt, um mit der gleichen Mesophyll-Leitfähigkeit  $g_m$  für nitrat- und ammoniumernährte Pflanzen zu rechnen.



**Abbildung 8.4.:** Ergebnisse der Fit-Berechnungen. Die in Abbildung 8.3 dargestellten Daten wurden mit Hilfe der Gleichungen 8.19 und 8.20 gefittet.  $J_{E,F}$  (Datenpunkte) und  $J_{E,G}$  (Fitergebnisse dargestellt durch die Linie) von (A) nitrat- und (B) ammoniumernährten Pflanzen.  $C_i$  (Datenpunkte) und berechnetes  $C_C$  (Linie) von (C) nitrat- und (D) ammoniumernährten Pflanzen. Bei den gemessenen Daten sind jeweils die Mittelwerte aus vier Messungen dargestellt. Die Mittelwerte der Fitparameter sind:  $g_m = 0.14 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $a_1 = 1.13$  ( $\text{NO}_3^-$ ),  $0.95$  ( $\text{NH}_4^+$ ),  $a_2 = 0.31 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $\text{NO}_3^-$ ),  $0.37 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ( $\text{NH}_4^+$ ).  $\Gamma_r^*$  wurde vorgegeben (30 ppm).

Auf den ersten Blick scheint eine Koinzidenz zwischen  $J_{E,F}$  und  $J_{E,G}$  gefunden werden zu können (Abbildung 8.4 A, B), wenn alle Elektronen zu  $\text{NADPH}/\text{H}^+$  für den Calvin-Zyklus fließen ( $R_B = J_B = 0$ ). Der Unterschied zwischen  $J_{E,F}$  und  $J_{E,G}$  in Abbildung 8.3 kann unter der Annahme erklärt werden, daß der Abfall von  $C_C$  (hervorgerufen durch ein geeignetes

$g_m$ , das mit Hilfe der Fitroutine bestimmt wurde) zu einer relativen Stimulierung des Elektronenflusses zur Photorespiration führt.

Die Ergebnisse stellen jedoch nicht einen endgültigen Beweis für die Annahme  $R_B = J_B = 0$  dar, da auch andere Lösungen in Übereinstimmung mit den Experimenten sind. So gibt es z.B. kein Argument, das die Interpretation einer unendlichen Mesophyll-Leitfähigkeit  $g_m$  ausschließt. In diesem Fall kann die Diskrepanz zwischen  $J_{E,F}$  und  $J_{E,G}$  in Abbildung 8.3 durch  $J_B$  und  $R_B$  überbrückt werden. Sehr wahrscheinlich spielen beide Effekte eine Rolle.

Die Hauptaussage der in Abbildung 8.4 A, B dargestellten Fitergebnisse beinhaltet, daß die Daten nicht der Hypothese widersprechen, daß die Diskrepanz zwischen  $J_{E,F}$  und  $J_{E,G}$  durch ein geeignetes, endliches  $g_m$  überbrückt werden kann, selbst dann, wenn dieses  $g_m$  und  $\Gamma_r^*$  als konstant und gleich groß in nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen angenommen werden.

Bei Betrachtung des Koeffizienten  $a_1$  (Gleichung 8.19) fällt jedoch auf, daß er in nitraternährten Pflanzen um 15% höher liegt als in ammoniumernährten Pflanzen (Bildunterschrift von Abbildung 8.4). Das niedrigere  $a_1$ , das für die ammoniumernährten Pflanzen bestimmt wurde, reicht nach obigen Rechnungen aus, um den Calvin-Zyklus mit Reduktionsäquivalenten zu beliefern. Daraus läßt sich schließen, daß der höhere Wert in nitraternährten Pflanzen auf einen Anteil von mindestens 15% von  $J_{E,F}$  hinweist, der nicht dazu benutzt wird, um den Calvin-Zyklus am Laufen zu halten. Wenn das vermutete  $R_B$  (oder  $J_B$ ) in Gleichung 8.18 eine ähnliche Lichtabhängigkeit besitzt wie  $4AQ$ , dann kann ihm die Fitroutine keine Extra-Komponente zuordnen. In diesem Fall (auch dann, wenn die Kurvenformen von  $R_B$  und  $4AQ$  in Abhängigkeit von der Lichtintensität nicht absolut gleich sind) wird die  $R_B$ -Komponente mit dem  $4AQ$ -Term vermischt, was zu einer Erhöhung von  $a_1$  führt. Der höhere Wert von  $a_1$  stimmt gut mit den Ergebnissen aus Tabelle 8.1 D überein, die beinhalten, daß das höhere  $\Gamma_m^*$  durch einen lichtabhängigen Fluß erklärt werden kann, der nicht zur Aufrechterhaltung des Calvin-Zyklus benötigt wird.

Beim Vergleich der Gleichungen 8.18 und 8.19 zeigt sich, daß die physikalische Bedeutung des Parameters  $a_2$  die Lichtatmung  $R_d$  ist. Die in der Bildunterschrift von Abbildung 8.4 angegebenen Werte sind für nitraternährte Pflanzen ähnlich denen in Tabelle 8.1 A ( $0.31$  bzw.  $0.24 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Der höhere Wert bei den ammoniumernährten Pflanzen aus Tabelle 8.1 A konnte jedoch durch die Fitroutine nicht gefunden werden. Dem sollte allerdings nicht zuviel Bedeutung beigemessen werden, da in der Fitroutine zuviele Freiheitsgrade sind. Dadurch kann der relativ kleine  $a_2$ -Term durch kleinere Veränderungen im  $a_1$ -Term verfälscht werden.

Abbildung 8.4 C, D zeigt auch den Intensitätsverlauf der beiden  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen  $C_C$  und  $C_i$ . Es zeigt sich, daß die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Chloroplasten ( $C_C$ ) sogar bei hohen Flüssen sinnvolle Werte annimmt. Dies bedeutet, daß das Verhalten von  $C_C$  kein Argument gegen obige  $g_m$ -Hypothese liefert, mit deren Hilfe die Diskrepanz zwischen  $J_{E,F}$  und  $J_{E,G}$  erklärt werden sollte, die sich wegen der Ergebnisse in Tabelle 8.1 (die sich aus den Unter-

schieden im gemessenen  $\Gamma_m^*$  bei nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen ergaben) jedoch als relativ unwahrscheinlich erweist.

## 8.4. Zusammenfassung

Die Messungen von  $\Gamma^*$  lieferten einen Hinweis auf die Existenz einer stärkeren, lichtabhängigen  $\text{CO}_2$ -Entwicklung  $R_B$  in nitraternährten Pflanzen. Eine solche Aussage war nicht so offensichtlich beim Vergleich von  $J_{E,F}$  (Gleichung 8.12) und  $J_{E,G}$  (Gleichungen 8.13 und 8.16). Die Kurvenform in Abbildung 8.3 beinhaltet allerdings nicht genügend Charakteristika, um alle 6 Parameter ( $a_1$ ,  $a_2$ ,  $R_B$ ,  $J_B$ ,  $\Gamma^*$  und  $g_m$ , Gleichungen 8.18 und 8.19) bestimmen zu können. Daher handelt es sich dabei um eine eher ungeeignete Methode zur Beantwortung der Fragestellung, ob Flüsse, die nicht im Calvin-Zyklus enden, involviert sind oder nicht. Der einzige Hinweis auf ihre Existenz ist das um 15% höhere  $a_1$  in nitraternährten Pflanzen. Dieses  $a_1$  kam jedoch unter der Hypothese zustande, daß der Unterschied zwischen  $J_{E,F}$  und  $J_{E,G}$  durch einen hypothetischen, relativ niedrigen Wert der Mesophyll-Leitfähigkeit  $g_m$  entsteht. Der Unterschied zwischen  $a_{1,3}$  und  $a_{1,4}$  kann größer werden, wenn die tatsächliche Mesophyll-Leitfähigkeit  $g_m$  größer ist als die Mesophyll-Leitfähigkeit  $g_m$ , die sich bei den Fits ergab.

Es stellt sich die Frage, ob dieser zusätzliche Elektronenfluß in nitraternährten Pflanzen mit der Zunahme  $\Delta R_B$  in Tabelle 8.1 verglichen werden kann, die 22% von  $V_C$  unter  $\Gamma^*$ -Bedingungen ausmacht. Beide Flüsse sollten mit der Intensität zunehmen,  $\Delta R_B$  sollte jedoch im Gegensatz zu  $V_C$  unempfindlich gegenüber der  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Chloroplasten  $C_C$  sein.  $V_C$  verringert sich etwa um den Faktor 2 mit der Lichtintensität unter den Bedingungen in Abbildung 8.4. Also könnte das Verhältnis  $\Delta R_B/V_C$  bei Erhöhung der Lichtintensität sogar noch zunehmen. Wird dies in Betracht gezogen, scheint der Unterschied von  $a_{1,3}$  und  $a_{1,4}$  zu gering. Die Antwort ergibt sich daraus, daß sowohl  $J_B$  als auch  $R_B$  zu einem höheren  $J_{E,G}$  beitragen können (Gleichung 8.18), aber nur  $R_B$  Auswirkungen auf  $\Gamma_m^*$  hat (Gleichung 8.9). Der Anteil  $\beta$  von  $J_B$

$$\beta = \frac{R_B}{J_B} \quad (8.21)$$

der zur  $\text{CO}_2$ -Entwicklung ( $R_B$ ) beiträgt, könnte von der Stickstoffernährung abhängen. Dies würde beinhalten, daß in nitraternährten Pflanzen nicht nur  $a_1$  ( $J_B$ ) höher ist, sondern auch der Anteil  $\beta$ , der zur  $\text{CO}_2$ -Entwicklung ( $R_B$ ) führt.

Die pflanzenphysiologische Grundlage für ein variables  $\beta$  ist die Variabilität in der Kopplung von metabolischen Wegen zwischen Chloroplasten, Mitochondrien und dem Cytosol. Ein solcher Unterschied zwischen nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen ist der Stickstoffmetabolismus.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich die Differenz in  $\Gamma_m^*$  durch eine unterschiedliche lichtabhängige  $\text{CO}_2$ -Entwicklung ( $R_B$ ) in nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen erklären

läßt. Die Ursache dafür ist in der Kopplung zwischen den Zellkompartimenten zu suchen. Mit Hilfe der Dunkelatmung wird diese Fragestellung in Kapitel 10 näher untersucht.

Das hypothetische  $C_C$  in Abbildung 8.4 zeigt keine stickstoffspezifischen Unterschiede. Daher ergibt sich aus dem Vergleich von  $J_{E,F}$  und  $J_{E,G}$  kein Hinweis auf eine unterschiedliche Photorespiration in nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen.

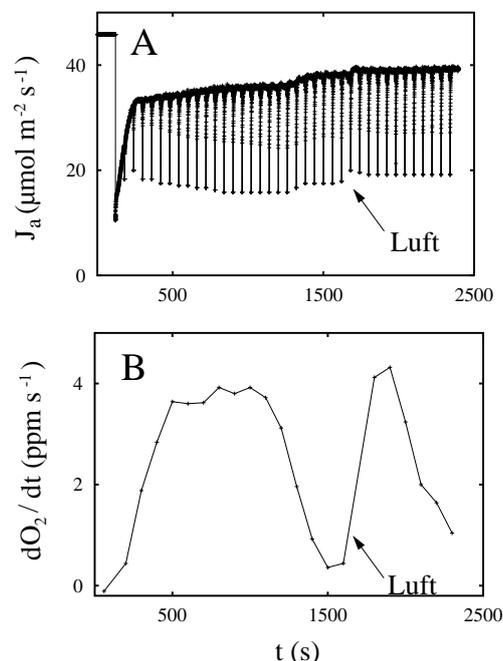
Eine wichtige Voraussetzung für den Flußvergleich aus Chlorophyll-Fluoreszenz und  $\text{CO}_2$ -Assimilation war die Vermutung, daß sich Änderungen der  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Chloroplasten ( $C_C$ ) unmittelbar auf die Chlorophyll-Fluoreszenz auswirken. Wieweit diese Annahme zulässig ist, wird im folgenden Kapitel näher untersucht.

## 9. Umschalten der Rubisco von CO<sub>2</sub>- auf O<sub>2</sub>-Bindung

In den Gleichungen 8.13 und 8.18 wurde davon ausgegangen, daß der Calvin-Zyklus Elektronen (in Form von NADPH/H<sup>+</sup>) annimmt, wenn die Rubisco sowohl als Carboxylase oder auch als Oxygenase arbeitet. Im folgenden Kapitel wird daher genauer untersucht, wie die photosynthetischen Größen auf Veränderungen des CO<sub>2</sub>-Gehalts reagieren.

Dazu wird die Tatsache ausgenutzt, daß die Meßkammer der Clark-Elektrode während einer Messung unter Lichteinwirkung an CO<sub>2</sub> verarmt (Spors, 1997).

### 9.1. Ursache für die Abnahme der Sauerstoffrate

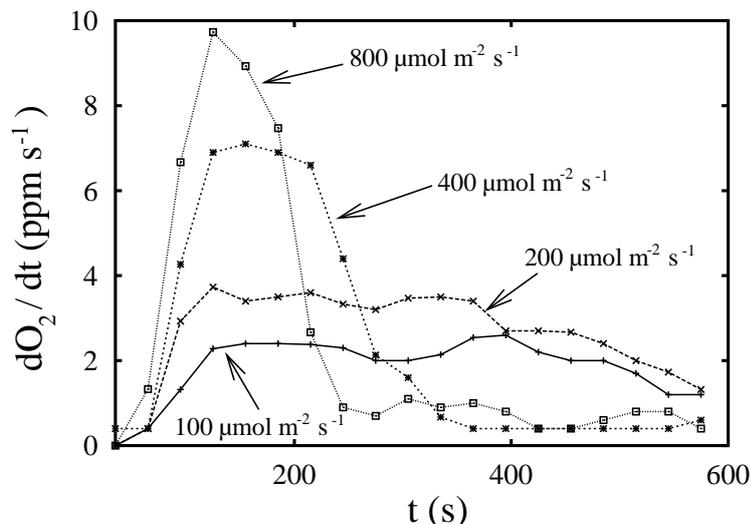


**Abbildung 9.1.:** FC-Messung (A) und Sauerstoffrate (B) eines ammoniumernährten Bohnenblattes bei einer Aktinlichtintensität von  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Bei 1670 s wurde die Meßkammer mit "Luft" (20 % O<sub>2</sub>, 0.03 % CO<sub>2</sub>, Rest: N<sub>2</sub>) gespült.

Abbildung 9.1 zeigt eine 40minütige Messung, die mit der FC-Maschine (Abbildung 9.1 A) und mit der Clark-Elektrode (Abbildung 9.1 B) bei einer Aktinlichtintensität von  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in der geschlossenen Meßkammer der Clark-Elektrode durchgeführt wurde. Es zeigt sich, daß ab ungefähr 1200 s eine Abnahme der Sauerstoffrate erfolgt, während kein Effekt im Elektronenfluß  $J_p$  zu beobachten ist.

Spors (1997), die ebenfalls eine Abnahme der Sauerstoffrate während ähnlicher Messungen beobachtete, vermutete, daß durch die photosynthetischen Reaktionen das  $\text{CO}_2$  in der geschlossenen Meßkammer abnimmt. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Kammer nach der Abnahme der Sauerstoffrate zum Zeitpunkt  $t = 1670 \text{ s}$  mit "Luft" (20 %  $\text{O}_2$ , 0.03 %  $\text{CO}_2$ , Rest:  $\text{N}_2$ ) gespült. Während bei der FC-Messung nur ein geringer Effekt durch die Luftspülung auf den Elektronenfluß  $J_p$  zu erkennen ist, nimmt die Sauerstoffrate wieder deutlich zu (Abbildung 9.1 B). Ursache dafür ist das  $\text{CO}_2$ , das der Kammer zugeführt wurde.

Im folgenden wird die Abnahme der Sauerstoffrate in Abhängigkeit von der eingestrahlenen Aktinlichtintensität untersucht. Abbildung 9.2 zeigt vier Sauerstoffmessungen am selben Blatt bei vier unterschiedlichen Lichtintensitäten (100, 200, 400 und  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Bei der höchsten Lichtintensität ist die Sauerstoffrate am größten. Wie zu erwarten war, ist in diesem Fall das  $\text{CO}_2$  in der Kammer auch am schnellsten aufgebraucht.

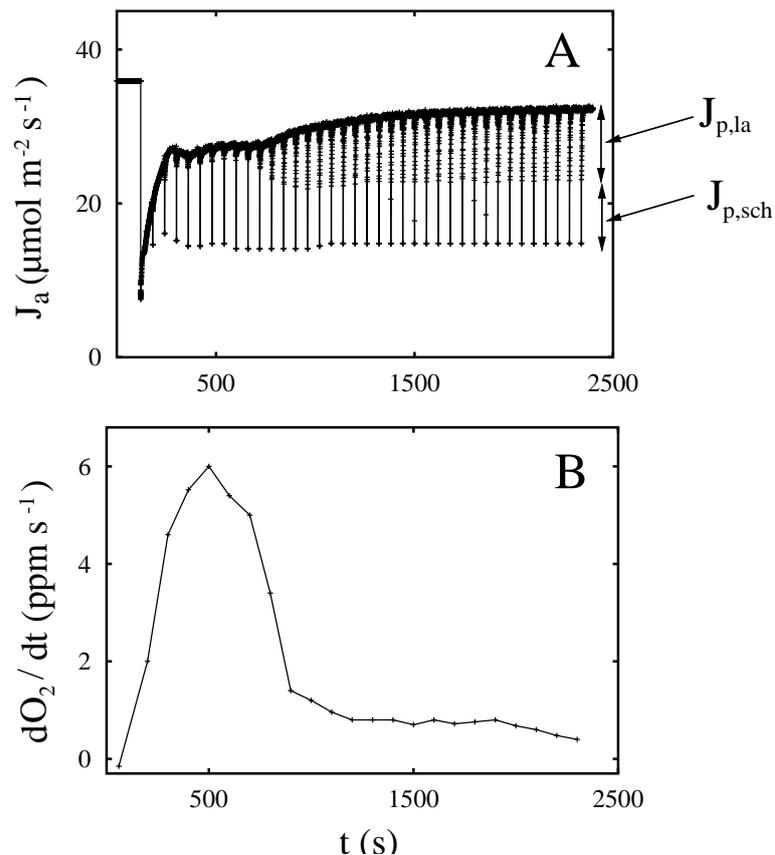


**Abbildung 9.2.:** Abhängigkeit der  $\text{CO}_2$ -Verarmung der Meßkammer von der Intensität des aktinischen Lichts. Die Rate der Sauerstoffentwicklung  $d\text{O}_2/dt$  wurde mit der Clark-Elektrode an einem nitrat-ernährten Bohnenblatt bestimmt. Die Intensität des aktinischen Lichts betrug 100, 200, 400 und  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Aufgrund dieser Untersuchungen ist davon auszugehen, daß  $\text{CO}_2$ -Verarmung in der Kammer für die Abnahme der Sauerstoffentwicklung verantwortlich ist. Nun soll näher untersucht werden, welche Prozesse für das nicht-parallele Verhalten von Elektronenfluß und Sauerstoffrate verantwortlich sind.

## 9.2. Messungen bei RuBP-Limitierung

Bei unterschiedlichen Lichtintensitäten wirken verschiedene Prozesse limitierend auf die Photosynthese: Bei geringen Intensitäten ist der Elektronenfluß limitierend, was sich begrenzend auf die Regeneration des RuBP im Calvin-Zyklus als Ausgangsstoff für Carboxylierung und Oxygenierung auswirkt. Bei hohen Lichtintensitäten ist die Photosynthese durch die Kapazität der Rubisco und/oder die Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> limitiert (Evans, 1986; Krömer et al., 1993; Ögren und Evans, 1993).



**Abbildung 9.3.:** FC-Messung (A) und Sauerstoffrate (B) eines ammoniumernährten Bohnenblattes bei einer Aktinlichtintensität von  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in der geschlossenen Meßkammer der Clark-Elektrode.

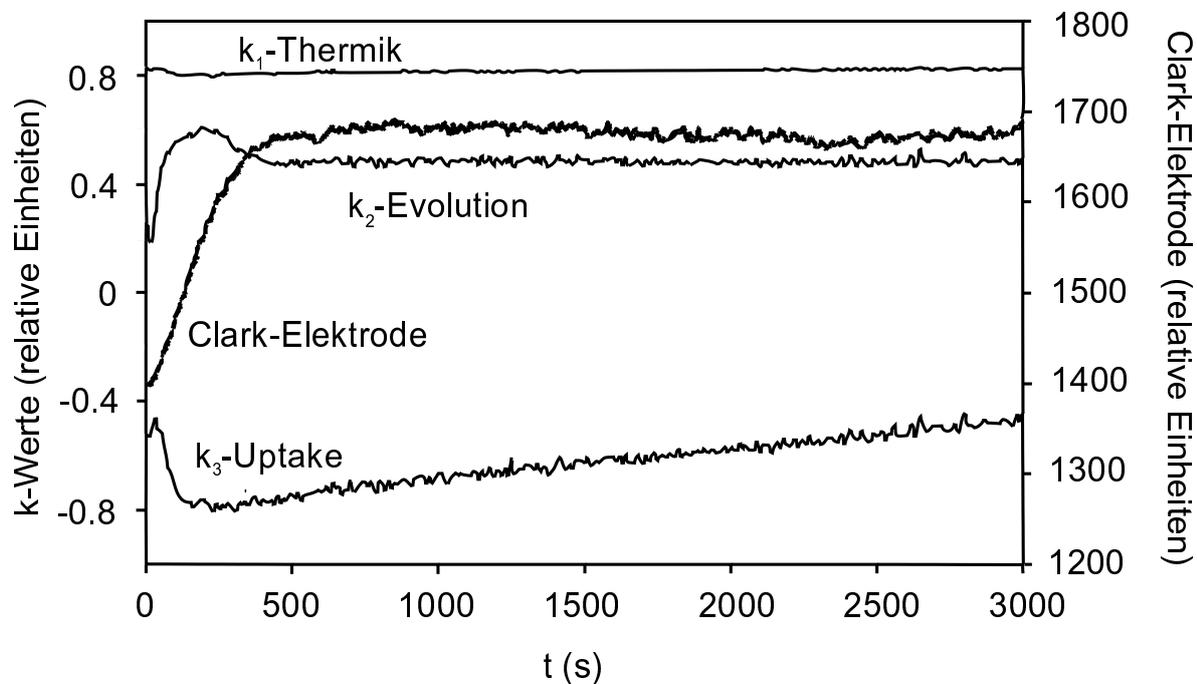
In Abbildung 9.3 ist eine 40 minütige Messung an einem ammoniumernährten Bohnenblattes dargestellt, die bei einer Aktinlichtintensität von  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durchgeführt wurde (Schinner et al., 2001). Während die Sauerstoffrate nach ca. 700 s eine deutliche Abnahme zeigt, bleibt der Elektronenfluß  $J_p$  erhalten. Es tritt sogar eine weitere Zunahme auf. Es sind zwei Effekte zu beobachten:

1. Elektronenfluß und Sauerstoffrate verhalten sich nicht parallel.
2. Gleichzeitig mit Abnahme der Sauerstoffrate ändert sich bei der Fluoreszenzmessung das

Rückstellverhalten nach einem sättigenden Blitz (Abbildung 9.3 A). Es sind zwei Rückstellkomponenten zu sehen: eine schnelle Komponente ( $J_{p,sch}$ ), die schon während maximaler Sauerstoffrate zu Beginn der Messung vorhanden war, und eine langsame Komponente ( $J_{p,la}$ ), die erst bei Abnahme der Sauerstoffrate auftritt. Abschnitt 9.6 wird sich genauer mit dem Zeitverhalten der beiden Komponenten beschäftigen.

Als Erklärung für das unterschiedliche Verhalten von Elektronenfluß und Sauerstoff kommen Prozesse in Frage, die in der Lage sind, Elektronen bzw. Reduktionsäquivalente und an PS II entstandenen Sauerstoff zu verbrauchen und evtl.  $\text{CO}_2$  freizusetzen. Mögliche Kandidaten hierfür sind die Mehler-Reaktion, die Photorespiration und Reaktionen in den Mitochondrien.

Zur Unterscheidung von schnellen und langsamen Gasflußprozessen wurden in Kooperation mit Wulff (2000) und Spors (2001) parallele Messungen der Clark-Elektrode mit dem Photoakustik-Aufbau durchgeführt.



**Abbildung 9.4.:** Parallele Messung mit Clark-Elektrode und Photoakustik an einem Gierschblatt bei einer Lichtintensität von  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Gemeinsame Messung von Wulff (2000) und Spors (2001).

Wie bereits in Kapitel 4.1.3 erwähnt, hat die Photoakustik den Vorteil, daß sie nur Prozesse detektiert, die innerhalb von 35 ms nach einem Lichtpuls ablaufen. Daher kann in diesem Fall eine mögliche Beteiligung der Photorespiration und der Prozesse in den Mitochondrien ausgeschlossen werden, während mit der Clark-Elektrode die Netto-Sauerstoffrate bestimmt wird, die sich aus der Sauerstoffentstehung an PS II, der Mehler-Reaktion, der Photorespiration und den Reaktionen in den Mitochondrien zusammensetzt. Der Nachteil

der Photoakustik-Messungen liegt darin, daß die Apparatur nur relativ geringe Lichtintensitäten liefert. Um dennoch mit diesen geringen Lichtintensitäten eine CO<sub>2</sub>-Verarmung der Kammer zu erreichen, wurde an der Schattenpflanze Giersch bei einer Lichtintensität von  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  gemessen.

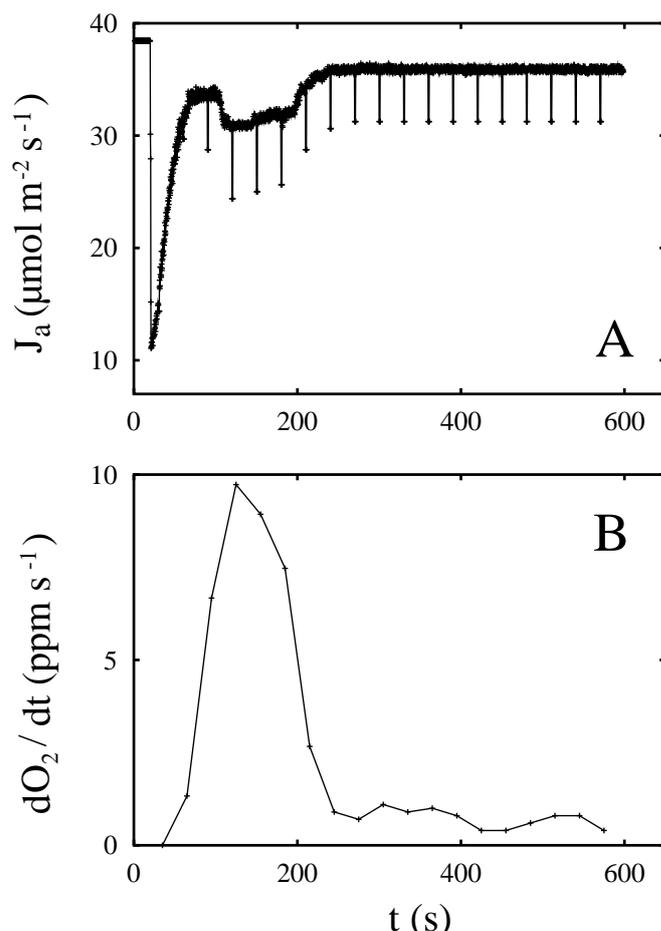
In Abbildung 9.4 sind der Verlauf der Sauerstoffentwicklung (gemessen mit der Clark-Elektrode) sowie die drei Photoakustik-Komponenten ( $k_1$ : Thermik,  $k_2$ : Sauerstoffentwicklung,  $k_3$ : CO<sub>2</sub>-Aufnahme durch die Lösung von CO<sub>2</sub> im Stroma bei licht-induzierter Alkalinisierung) abgebildet. Es ist zu erkennen, daß die mit der Clark-Elektrode gemessene Sauerstoffentwicklung bei ungefähr 400 s in die Sättigung geht, was auf die CO<sub>2</sub>-Verarmung der Meßkammer zurückzuführen ist. Interessant ist der Vergleich mit der aus den Photoakustik-Antworten bestimmten Sauerstoffevolution  $k_2$ : Diese bleibt im Zeitbereich nach 400 s konstant. Zusätzlich ist anhand der CO<sub>2</sub>-Aufnahmekurve zu erkennen, daß im selben Zeitraum das Blatt weiterhin CO<sub>2</sub> aufnimmt. Diese Aufnahme nimmt langsam und linear ab.

Zusammengenommen bedeuten diese drei Effekte, daß Prozesse den im PS II entstandenen Sauerstoff (gemessen durch  $k_2$ ) verbrauchen und dadurch die von der Clark-Elektrode registrierte Brutto-Sauerstoffentwicklung Null ist. Die erhebliche CO<sub>2</sub>-Aufnahme-Komponente  $k_3$  beweist, daß bei diesen Prozessen CO<sub>2</sub> entsteht, das vom Blatt wieder aufgenommen wird.

### 9.3. Messungen bei Rubisco-Limitierung

Obige Messungen, die das nicht-parallele Zeitverhalten des Elektronenflusses und der Sauerstoffrate zeigen, wurden bei relativ geringen Aktinlichtintensitäten von  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durchgeführt. Es ist daher davon auszugehen, daß obige Messungen bei RuBP-Limitierung stattfanden. Im folgenden soll nun untersucht werden, wie sich Elektronenfluß und Sauerstoffrate unter Rubisco-Limitierung bei CO<sub>2</sub>-Verarmung der Meßkammer verhalten.

In Abbildung 9.5 ist eine 10 minütige Messung des Exzitonенflusses und der Sauerstoffrate bei einer Aktinlichtintensität von  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  dargestellt. In diesem Fall verhalten sich Elektronenfluß und Sauerstoffrate parallel:  $J_p$  als Länge der abwärtsgerichteten Blitzantworten wird mit der Abnahme der Sauerstoffrate kleiner. Da der Elektronenfluß stockt, steigt die thermische Deaktivierung (Abstand von Null bis zur unteren Spitze der Blitzantworten) so stark an, daß der Gesamtfluß  $J_p + J_d$  größer als vorher wird (Abbildung 9.5 A). Da bei  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  die Rubisco limitierend wirkt, kann unter CO<sub>2</sub>-Verarmung kein Umschalten der Rubisco von CO<sub>2</sub> auf O<sub>2</sub> erfolgen. Dies ginge ohne Auswirkung auf den Elektronenfluß an PS II vonstatten. Zusätzlich kann es sein, daß die Prozesse außerhalb des Chloroplasten, die O<sub>2</sub> verbrauchen und bei  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in der Lage waren, den Elektronenfluß aufrechtzuerhalten, ebenfalls ausgelastet sind.

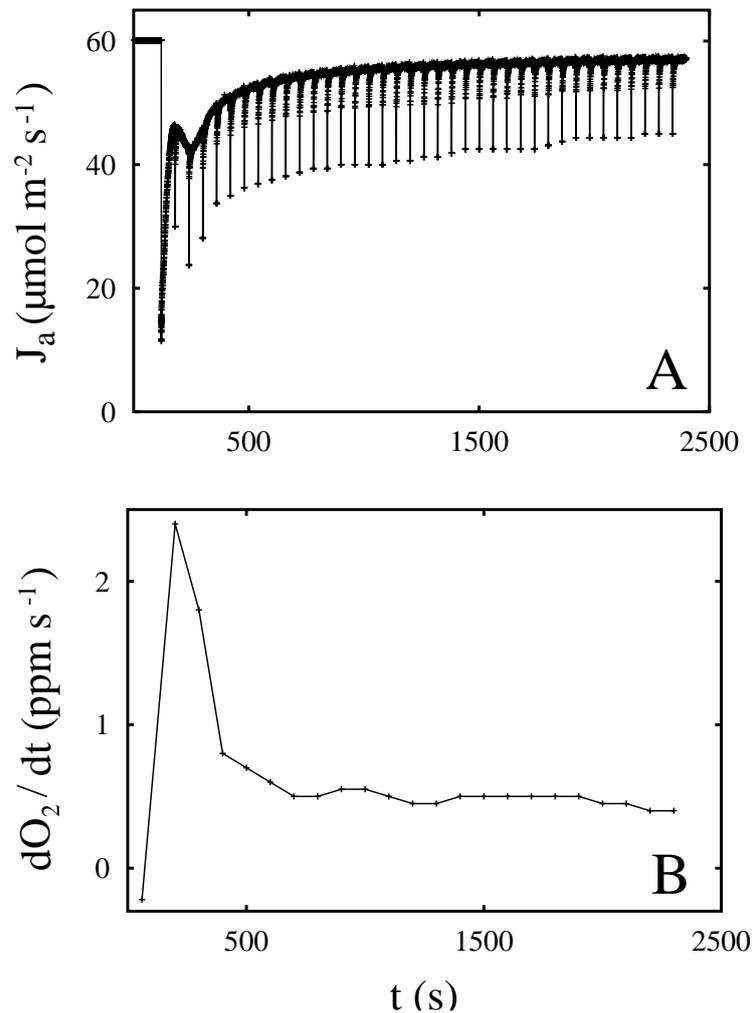


**Abbildung 9.5.:** FC-Messung (A) und Sauerstoffrate (B) eines nitraternährten Bohnenblattes bei einer Aktinlichtintensität von  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

#### 9.4. Messungen unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen

Ein Erklärungsansatz für die Aufrechterhaltung des Elektronenflusses unter  $\text{CO}_2$ -Verarmung bei  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  war, daß die Rubisco von  $\text{CO}_2$  auf  $\text{O}_2$  umschaltet. Dieser Prozeß und die Mehler-Reaktion können ausgeschaltet werden, wenn die  $\text{O}_2$ -Konzentration in der Meßkammer von 20 % auf 2 % verringert wird. Für die in Abbildung 9.6 dargestellte Messung wurde die Kammer vor Beginn der Messung mit einer Gaszusammensetzung von 2 %  $\text{O}_2$ , 0.03 %  $\text{CO}_2$ , Rest:  $\text{N}_2$  gespült. Wiederum wurden der Exzitonfluß und die Sauerstoffrate bei einer Aktinlichtintensität von  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  über einen Zeitraum von 40 min bestimmt.

Im Vergleich zu den Werten, die sich bei der Messung unter 20 %  $\text{O}_2$  (Abbildung 9.3 A, B) ergaben, ist sowohl der Elektronenfluß (Abbildung 9.6 A) als auch die maximale Sauerstoffrate zu Beginn der Messung (Abbildung 9.6 B) reduziert. Dies deutet auf eine Verminderung der Elektronenakzeptoren hinter PS I hin. Die Abnahme der Sauerstoffrate tritt früher ein als



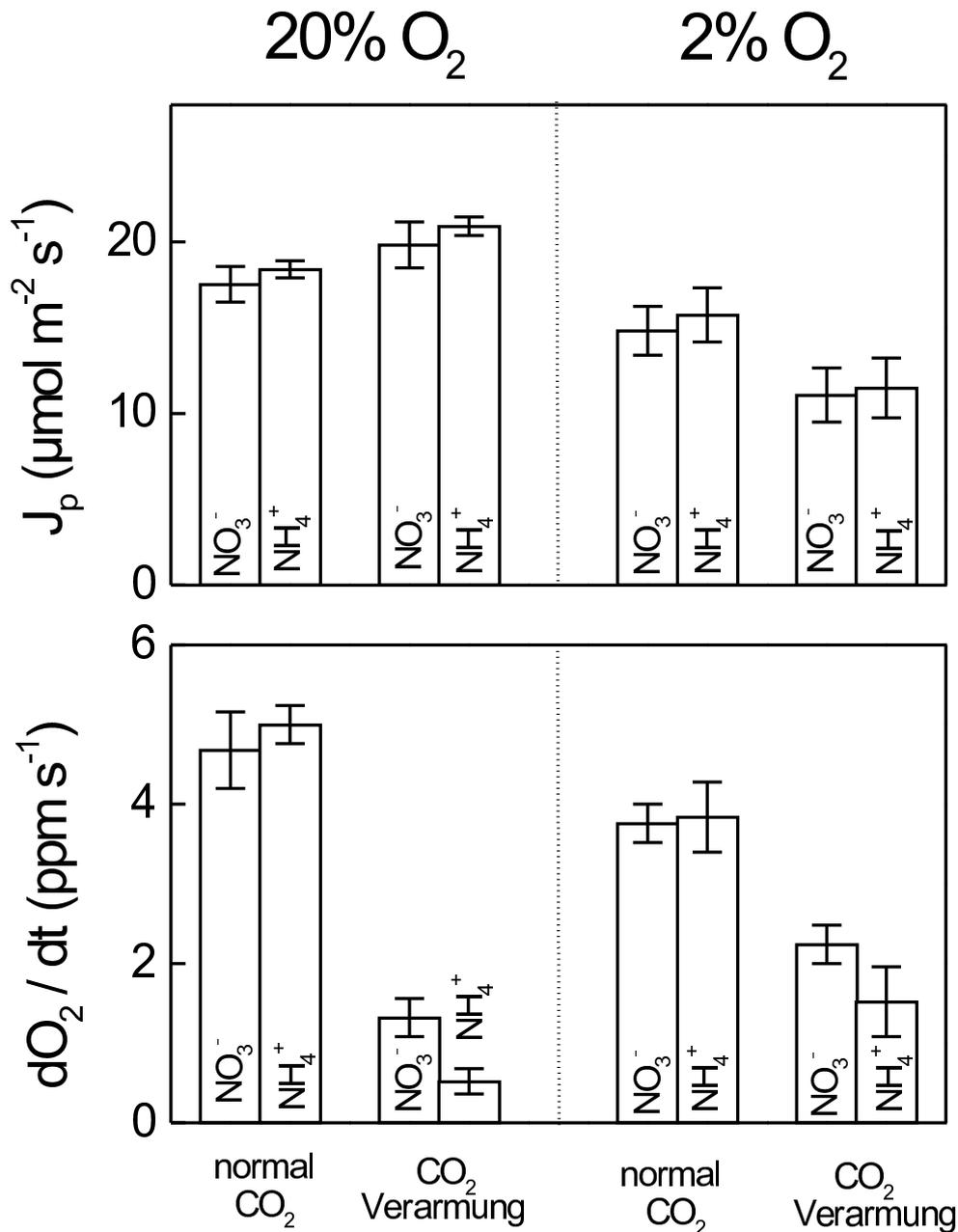
**Abbildung 9.6.:** FC-Messung (A) und Sauerstoffrate (B) eines ammoniumernährten Bohnenblattes bei einer Aktinlichtintensität von  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  unter 2 % O<sub>2</sub>, 0.03 % CO<sub>2</sub>, Rest: N<sub>2</sub>.

bei der Messung unter 20 % O<sub>2</sub> (Abbildung 9.3 B). Das läßt vermuten, daß der an PS II entstandene Sauerstoff sofort durch sauerstoffverbrauchende Prozesse innerhalb der Zelle reifiziert wird oder daß in den ablaufenden Reaktionen innerhalb der Zelle weniger CO<sub>2</sub> erzeugt wird. Außerdem fällt auf, daß die langsame Rückstellkomponente ( $J_{p,la}$ ) schon zu Beginn der Messung vorhanden ist.

## 9.5. Übersicht der Ergebnisse

In Abbildung 9.7 ist eine Übersicht der in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Messungen dargestellt. Es wurden der Elektronenfluß  $J_p$  und die Rate der Sauerstoffentwicklung  $dO_2/dt$  für nitrat- und ammoniumernährte Pflanzen unter 20 % O<sub>2</sub> bei einer CO<sub>2</sub>-

Konzentration von 0.03 % ("normal CO<sub>2</sub>") sowie unter CO<sub>2</sub>-Verarmung bestimmt. Dieselben Parameter sind für die Messungen unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen (2 % O<sub>2</sub>, 0.03 % CO<sub>2</sub>, Rest: N<sub>2</sub>) dargestellt.



**Abbildung 9.7.:** Elektronenfluß  $J_p$  und Rate der Sauerstoffentwicklung  $dO_2/dt$  von nitrat- und ammoniumernährten Blättern bei einer Aktinlichtintensität von  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Gaszusammensetzung in der Meßkammer betrug zu Beginn der Messung 20 % O<sub>2</sub> bzw. 2 % O<sub>2</sub>, 0.03 % CO<sub>2</sub>, Rest: N<sub>2</sub>. Während der 40 minütigen Messung trat CO<sub>2</sub>-Verarmung in der Kammer auf. Es ist der Mittelwert aus elf Messungen dargestellt.

Im Elektronenfluß sind keine stickstoffspezifischen Unterschiede zu beobachten. Für die Messungen unter 20 % O<sub>2</sub> ist die bereits erwähnte Stimulation von J<sub>p</sub> unter CO<sub>2</sub>-Verarmung zu erkennen. Unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen (2 % O<sub>2</sub> in Abbildung 9.7) ist der Elektronenfluß im Vergleich zu den Messungen unter 20 % geringer. Es tritt eine weitere Abnahme auf, wenn sich das CO<sub>2</sub> in der Meßkammer verringert.

Die Sauerstoffrate zeigt unter "normalen" CO<sub>2</sub>-Bedingungen ebenfalls keine signifikanten stickstoffspezifischen Unterschiede, weder unter photorespiratorischen (20 % O<sub>2</sub> in Abbildung 9.7) noch unter nicht-photorespiratorischen (2 % O<sub>2</sub> in Abbildung 9.7) Bedingungen. Unterschiede treten unter CO<sub>2</sub>-Verarmung der Meßkammer auf: Besonders unter photorespiratorischen Bedingungen ist die Sauerstoffrate der ammoniumernährten Pflanzen geringer als die der nitraternährten.

Bei der Interpretation der Sauerstoffmessungen ist allerdings zu berücksichtigen, daß sie auf die Fläche normiert sind, während sich die Fluoreszenzmessungen auf die Reaktionszentren beziehen. Wird die unterschiedliche Morphologie der nitrat- und ammoniumernährten Blätter in Betracht gezogen, d.h. wird die Sauerstoffrate auf die Anzahl der Zellen pro Fläche (Kapitel 6.1) normiert, so wird wegen der größeren Anzahl von Zellen pro Fläche bei ammoniumernährten Pflanzen der Unterschied in der Sauerstoffrate noch größer. Allerdings treten dann auch bereits Unterschiede unter "normalen" CO<sub>2</sub>-Bedingungen auf.

Die Abnahme der Sauerstoffrate bei CO<sub>2</sub>-Verarmung bei gleichbleibendem photosynthetischen Fluß J<sub>p</sub> ist nicht einfach zu erklären. Die Messungen können nur bedeuten, daß das O<sub>2</sub>, das bei PS II entwickelt wird und proportional zum Elektronenfluß J<sub>p</sub> ist, wieder eingefangen wird. Ein Kandidat hierfür wäre die Mehlerreaktion. Es ist jedoch nicht anzunehmen, daß sie solch große Mengen verarbeiten kann.

Die Photorespiration ist ein sehr wahrscheinlicher Elektronenakzeptor, der O<sub>2</sub> verbraucht. Zusätzlich entsteht bei dieser Reaktion CO<sub>2</sub>, das für die Carboxylierung benutzt werden kann, bei der wiederum Reduktionsäquivalente verbraucht werden.

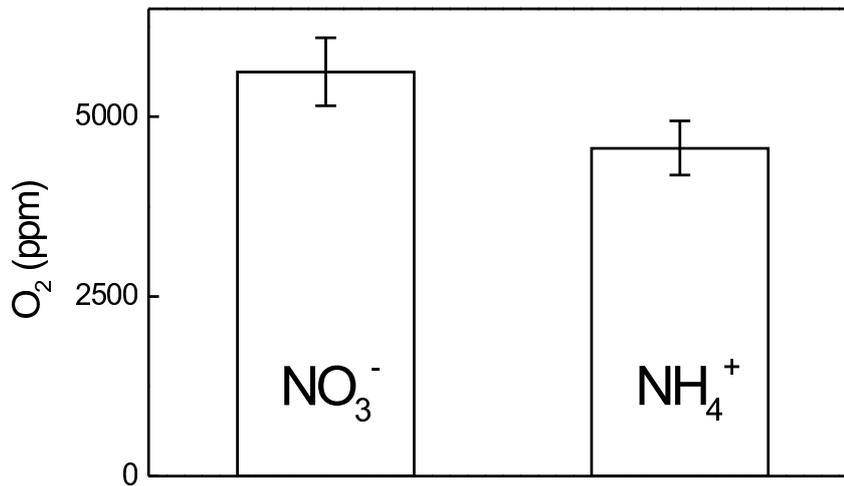
Ebenfalls einen dauerhaften Verbrauch des entwickelten O<sub>2</sub> könnte die Verbrennung der von der ETC gelieferten Reduktionsäquivalente in den Mitochondrien bewirken. Hierbei ist interessant, daß dieser Effekt stärker bei den ammoniumernährten Pflanzen ausgeprägt ist. Die nitraternährten Pflanzen geben einige Reduktionsäquivalente an die Aminosäuresynthese ab, brauchen also nicht so viel in den Mitochondrien zu verbrennen. Auch wird bei der Synthese einiger Aminosäuren wie z.B. Valin oder Isoleucin (Heldt, 1999) wieder CO<sub>2</sub> frei, als dann als nicht-O<sub>2</sub>-verbrauchender Akzeptor zur Verfügung steht.

Wenn bei 2 % O<sub>2</sub> die Photorespiration ausfällt, sinken, wie erwartet, der Elektronenfluß und auch die Sauerstoffrate. Es ist aber erstaunlich, daß bei CO<sub>2</sub>-Verarmung noch ein hoher Elektronenfluß J<sub>p</sub> und auch eine hohe Sauerstoffrate nachbleibt. Daß die Diskrepanz zwischen Elektronenfluß und Sauerstoffrate im rechten Teil von Abbildung 9.7 sehr viel kleiner wird (und bei nitraternährten Pflanzen fast verschwindet), paßt gut zu der Hypothese, daß die Diskrepanz im linken Teil von Abbildung 9.7 (bei 20 %) auf der Photorespiration sowie der

Verbrennung in den Mitochondrien beruht.

Diese würden bei 2 % O<sub>2</sub> auch weitgehend wegfallen. Die Größe der Flüsse ist jedoch erstaunlich. Es stellt sich die Frage, welcher Akzeptor die Elektronen übernimmt, aber kein O<sub>2</sub> verbraucht. Es ist neben der Nitratassimilation, die bei den ammoniumernährten Pflanzen aber wegfällt, auch an den Citrat-Zyklus zu denken, der die anfangs unter CO<sub>2</sub> gebildeten Kohlenwasserstoffe verarbeitet und dabei CO<sub>2</sub> entwickelt, was allerdings unwahrscheinlich ist, da die Mitochondrien die Reduktionsäquivalente nicht abnehmen können. Alle Erklärungen sind unbefriedigend. So bleibt für die Messungen unter 2 % O<sub>2</sub> die Suche nach einem Akzeptor, der unter den in der Literatur und in Kapitel 2 erörterten Akzeptoren nicht vorkommt.

Die Ergebnisse des nächsten Abschnitts weisen in den Versuchen unter 2 % O<sub>2</sub> auf eine große Rolle des Exports aus den Chloroplasten bereits unter ausreichend CO<sub>2</sub> hin.

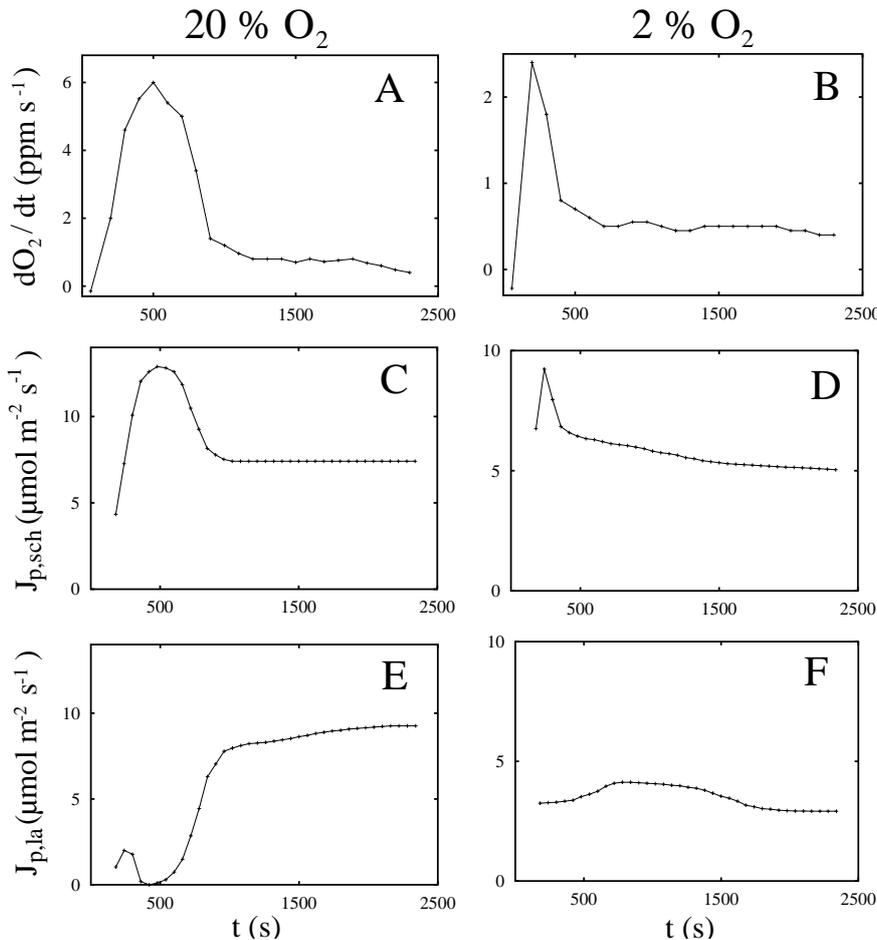


**Abbildung 9.8.:** Gesamt-Sauerstoffentwicklung (entspricht der Fläche in Abbildung 9.3 B) während 40 minütiger Beleuchtung der nitrat- und ammoniumernährten Blätter mit aktinischem Licht von  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Es ist der Mittelwert aus elf Messungen dargestellt.

Weiteren Aufschluß über die involvierten Prozesse ergibt die Berechnung der Gesamt-Sauerstoffentwicklung für die 40 minütige Messung unter 20 % O<sub>2</sub> (Abbildung 9.8). Da die Ausgangsmenge an CO<sub>2</sub> in der Kammer stickstoffunabhängig konstant ist, beinhaltet diese Größe, wieviel O<sub>2</sub> pro CO<sub>2</sub> in der Meßkammer freigesetzt wurde. In Übereinstimmung mit den Überlegungen zu Abbildung 9.7 zeigt es sich, daß bei den ammoniumernährten Pflanzen insgesamt weniger O<sub>2</sub> pro CO<sub>2</sub> freigesetzt wird. Der niedrigere Wert für NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in Abbildung 9.8 deutet auf einen stärkeren Sauerstoffverbrauch innerhalb der NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Zelle oder eine höhere CO<sub>2</sub>-Erzeugung der O<sub>2</sub>-verbrauchenden Reaktionen in der NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Zelle hin.

### 9.6. Zeitverhalten der schnellen und langsamen Rückstellkomponente nach einem sättigenden Blitz

In Abbildung 9.3 A fiel auf, daß im Elektronenfluß gleichzeitig mit Abnahme der Sauerstoffrate eine langsame Rückstellkomponente nach den sättigenden Blitzen auftritt. Aus den Daten der Abbildung 9.3 A und 9.6 A ist der Zeitverlauf des schnellen ( $J_{p,sch}$ ) und des langsamen Anteils ( $J_{p,la}$ ) für photorespiratorische (20 % O<sub>2</sub>) und nicht-photorespiratorische (2 % O<sub>2</sub>) Bedingungen aus der Länge der Blitz-induzierten Anteile ermittelt worden und in Abbildung 9.9 dargestellt. Zusätzlich ist noch einmal die bereits in den Abbildungen 9.3 B und



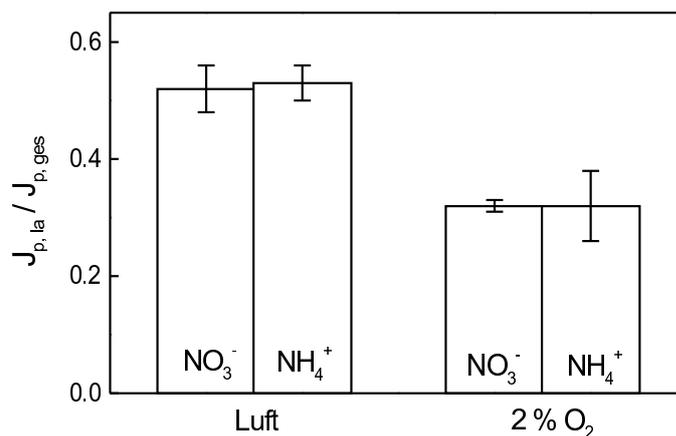
**Abbildung 9.9.:** Rate der Sauerstoffentwicklung  $dO_2/dt$  (A, B) unter photorespiratorischen (20 % O<sub>2</sub>) und nicht-photorespiratorischen (2 % O<sub>2</sub>) Bedingungen sowie die schnelle  $J_{p,sch}$  (C, D) und langsame  $J_{p,la}$  (E, F) Komponente des Elektronenflusses eines ammoniumernährten Bohnenblattes. Die Aktinlichtintensität betrug  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

9.6 B zeigte Sauerstoffrate abgebildet. Es fällt auf, daß unter Normalbedingungen (Abbildung 9.9 A, C, E) der schnelle Anteil ( $J_{p,sch}$ ) ein paralleles Verhalten zur Sauerstoffrate aufweist, während sich die langsame Komponente ( $J_{p,la}$ ) dazu invers verhält: Sie tritt erst bei

Abnahme der Sauerstoffrate auf.

Die Rückstellkomponente nach einem Sättigungsblitz ist ein Indikator für die Reoxidierung des Plastoquinonpools (PQ in Abbildung 2.2). Daher läßt sich vermuten, daß die schnelle Komponente Prozesse innerhalb des Chloroplasten widerspiegelt. Durch sie kann der PQ-Pool relativ schnell reoxidiert werden. Der schnelle Anteil tritt auch unter  $\text{CO}_2$ -Verarmung der Meßkammer auf (Abbildung 9.9 C). In diesem Fall gibt er wahrscheinlich den Anteil der Photorespiration wieder. Die Komponente  $J_{p,la}$  (Abbildung 9.9 E) ist ein Indikator für Prozesse, die den PQ-Pool langsam reoxidieren. Diese sind vermutlich durch Diffusionsprozesse limitiert und deshalb außerhalb des Chloroplasten lokalisiert. Der Vergleich von Abbildung 9.9 E und F zeigt, daß sie  $\text{O}_2$  verbrauchen. Daher handelt es sich wahrscheinlich um die Elektronentransportkette in den Mitochondrien.

Auch unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen (Abbildung 9.9 B, D, F) verhalten sich die Sauerstoffrate und die schnelle Komponente parallel. Der langsame Anteil (Abbildung 9.9 F) ist allerdings seit Beginn vorhanden und bei  $\text{CO}_2$ -Verarmung nicht stimulierbar.



**Abbildung 9.10.:** Langsamer Anteil  $J_{p,la}$  des photosynthetischen Elektronenflusses unter  $\text{CO}_2$ -Verarmung in der Meßkammer (normiert auf den gesamten Elektronenfluß  $J_{p,ges}$ ) der nitrat- und ammoniumernährten Blätter bei 20%  $\text{O}_2$  (Luft) und 2%  $\text{O}_2$ . Die Intensität des aktinischen Lichts betrug  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Es ist der Mittelwert aus elf Messungen dargestellt.

Diese Beobachtung ist auch in Abbildung 9.10 dargestellt. Es ist der Anteil der langsamen Komponente am Gesamt-Elektronenfluß ( $J_{p,la}/J_{p,ges}$ ) für nitrat- und ammoniumernährte Pflanzen unter 20%  $\text{O}_2$  bzw. 2%  $\text{O}_2$  bei  $\text{CO}_2$ -Verarmung der Meßkammer aufgetragen. Es sind keine stickstoffspezifischen Unterschiede zu erkennen. Dies steht nicht im Widerspruch zu Abbildung 9.8, da es durchaus möglich ist, daß der Redoxexport im Rahmen des Meßfehlers bei nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen gleich ist, wie ja auch die Elektronenflüsse in Abbildung 9.7 gleich waren. Nur die Art der Akzeptoren kann verschieden sein. Die Akzeptoren in nitraternährten Pflanzen führen zur  $\text{CO}_2$ -Entwicklung oder zu geringerem  $\text{O}_2$ -Verbrauch und ergeben so eine höhere Netto- $\text{O}_2$ -Entwicklung, wie im vorherigen

Abschnitt diskutiert wurde.

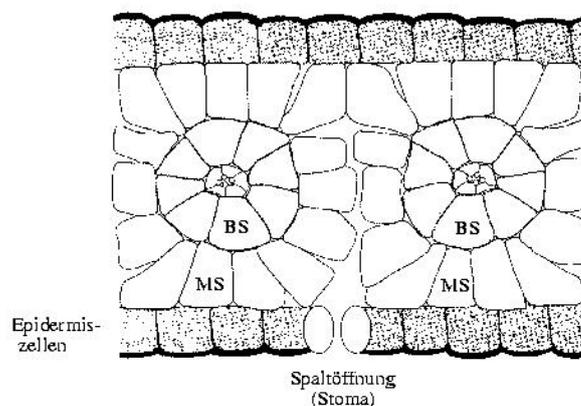
Daß der langsame Anteil unter 2 % O<sub>2</sub> konstant von Anfang an vorhanden ist, zeigt, daß hier Akzeptoren ins Spiel kommen, die von Anfang an durch den Wegfall der Photorespiration stimuliert werden. Wie oben bereits erwähnt, ist ihre Identität unklar, aber sie existieren.

Bei diesen Messungen wird der Vorteil der FC-Maschine deutlich. Es konnten direkt die Sauerstoffrate und die verschiedenen Komponenten des Elektronenflusses miteinander verglichen werden. Mit dem PAM wären die beobachteten Effekte erst nach Invertierung mit höheren Streuungen zu erkennen gewesen.

## 9.7. Messungen von Elektronenfluß und Sauerstoffentwicklung an Maisblättern

Zur Vereinfachung der Interpretation werden im folgenden Abschnitt Messungen an Pflanzen gezeigt, die eine verminderte Photorespiration haben. Es handelt sich hierbei um Mais, einen Vertreter der C<sub>4</sub>-Pflanzen.

### 9.7.1. CO<sub>2</sub>-Metabolismus in C<sub>4</sub>-Pflanzen

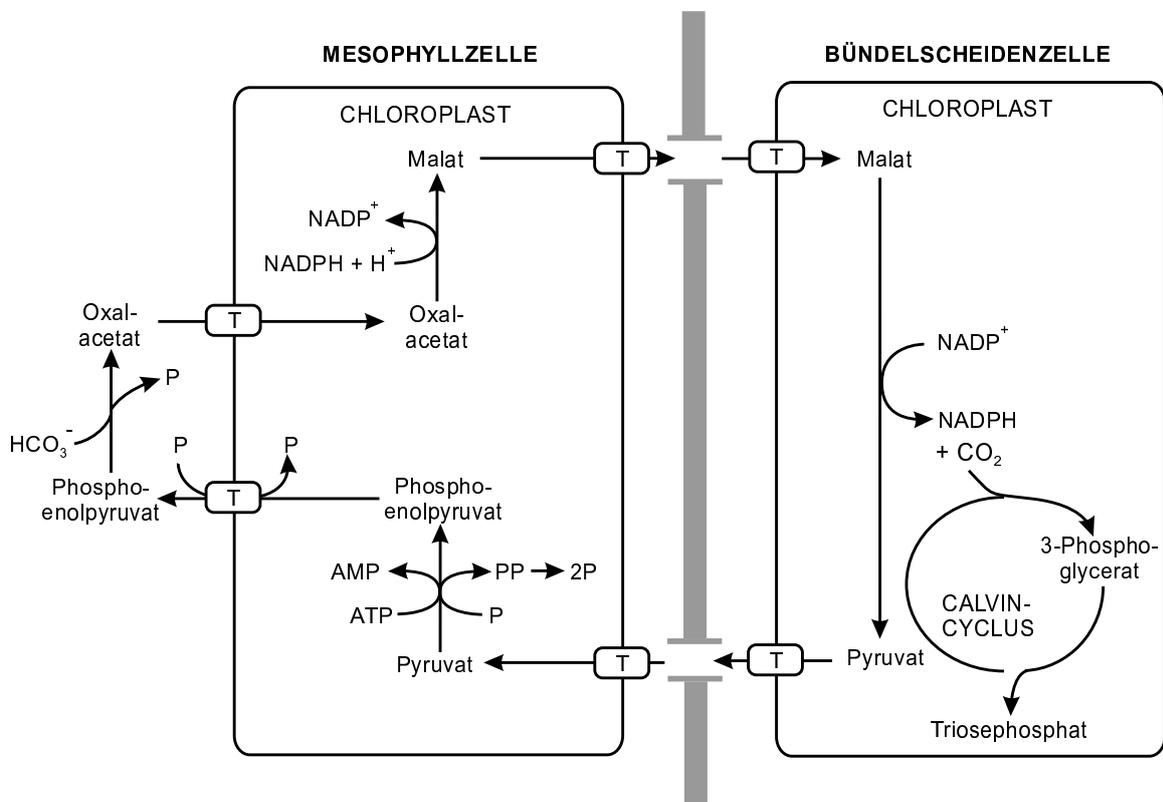


**Abbildung 9.11.:** Schematische Darstellung der Blattanatomie einer C<sub>4</sub>-Pflanze (Kranzanatomie). BS: Bündelscheidenzellen, MS: Mesophyllzellen. (Heldt, 1999).

Wie bereits in Kapitel 6.1 erwähnt, muß während der Photosynthese ein Optimum erreicht werden zwischen Wasserverlust durch die Stomata (Transpiration) und der Möglichkeit zur

CO<sub>2</sub>-Aufnahme. Dies kann besonders in warmen und trockenen Gebieten ein Problem darstellen. C<sub>4</sub>-Pflanzen haben einen Weg gefunden, den Wasserverbrauch bei der Photosynthese wesentlich zu verringern. Sie benötigen nur 400 bis 600 mol Wasser für die Fixierung von einem mol CO<sub>2</sub>. Dies entspricht etwa der Hälfte des entsprechenden Wasserverbrauchs von C<sub>3</sub>-Pflanzen, der bei 700 bis 1300 mol liegt (Heldt, 1999).

Alle C<sub>4</sub>-Pflanzen zeigen eine sogenannte Kranzanatomie (Abbildung 9.11): Die Bündelscheidenzellen in der Mitte werden durch Mesophyllzellen umschlossen, die ihrerseits Kontakt mit dem interzellulären Gasraum der Blätter haben. Die Grenze zwischen Mesophyll- und Bündelscheidenzellen wird durch eine große Anzahl von Plasmodesmen (Abbildung 2.1) unterbrochen, die einen Diffusionsstrom von Metaboliten zwischen den Mesophyll- und den Bündelscheidenzellen ermöglichen.



**Abbildung 9.12.:** CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus von C<sub>4</sub>-Pflanzen (NADP-Malatenzymtyp, Beispiel Mais). Im Cytosol der Mesophyllzellen wird HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> durch Reaktion mit Phosphoenolpyruvat gebunden. Das entstandene Oxalacetat wird in den Chloroplasten der Mesophyllzellen zu Malat reduziert. Das Malat diffundiert in die Bündelscheidenzellen und wird dort unter Bildung von CO<sub>2</sub> oxidativ decarboxyliert. Das dabei gebildete Pyruvat wird in den Chloroplasten der Mesophyllzellen zu Phosphoenolpyruvat phosphoryliert (Heldt, 1999).

Der entscheidende Punkt für den Ablauf der C<sub>4</sub>-Photosynthese ist das Vorhandensein einer Pumpe, durch die das CO<sub>2</sub> von der relativ niedrigen Konzentrationen in den Mesophyllzellen

len durch Überführung in die Bündelscheidenzellen, in denen der Calvin-Zyklus stattfindet (Abbildung 9.12), auf eine ungefähr 14-fach höhere Konzentration angehoben wird. Bei sehr hohen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Umgebung der Rubisco wird die Oxygenasereaktion fast völlig unterdrückt (Krause, 1994). So ist der Anteil der Photorespiration unter atmosphärischen O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen nur 1.6 % der Netto-CO<sub>2</sub>-Assimilation (Edwards und Baker, 1993).

### 9.7.2. Flüsse unter CO<sub>2</sub>-Verarmung bei Mais

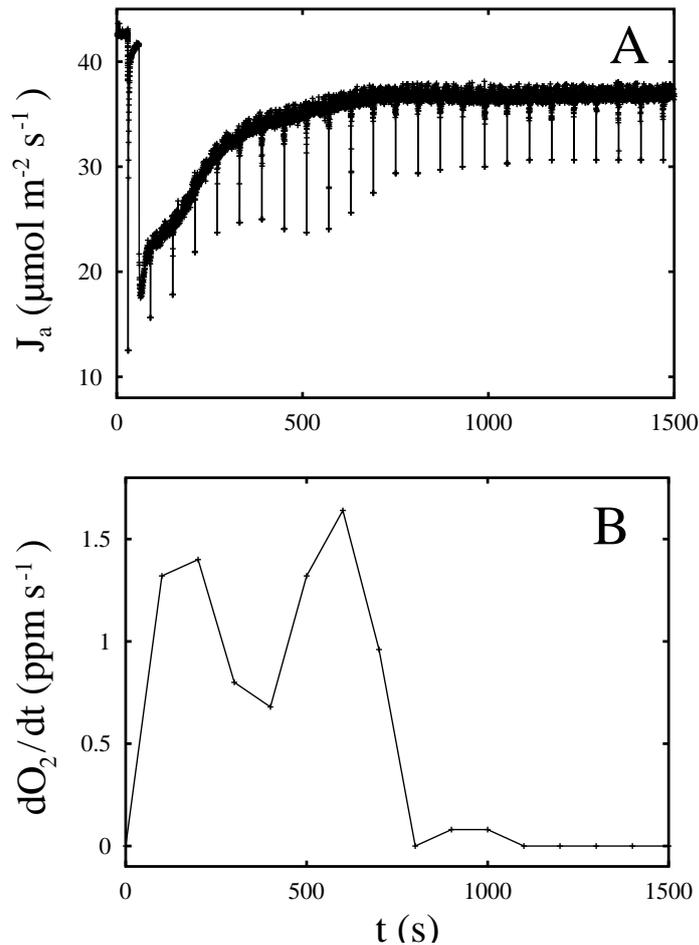
Die mit der C<sub>3</sub>-Pflanze Buschbohne in den vorherigen Abschnitten dargestellten Messungen unter CO<sub>2</sub>-Verarmung in der Meßkammer wurden auch mit der C<sub>4</sub>-Pflanze Mais durchgeführt. Abbildung 9.13 zeigt als Beispiel die ersten 25 min einer 40-minütigen Messung, in der der Exzitonenfluß (Abbildung 9.13 A) und die Sauerstoffrate (Abbildung 9.13 B) bei einer Aktinlicht-Intensität von  $560 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bestimmt wurden (in den letzten, nicht dargestellten 15 min der Messung blieben die Werte konstant).

Zu beobachten ist (anders als bei den Buschbohnen unter niedrigen Aktinlichtintensitäten, Abbildung 9.3) ein paralleles Verhalten von Elektronenfluß  $J_p$  (erkennbar an der Länge der Sättigungsblitze) und Sauerstoffrate. Messungen dieser Art wurden unter verschiedenen Aktinlichtintensitäten ( $I = 150, 250, 450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durchgeführt. Unabhängig von der Intensität war stets ein paralleles Verhalten der beiden Meßgrößen zu beobachten. Außerdem trat die langsame Komponente des Elektronenflusses, die bei Buschbohnen nach Abnahme der Sauerstoffrate zugeschaltet wurde, unter CO<sub>2</sub>-Verarmung der Meßkammer nicht auf.

In der Literatur werden häufig Messungen des Elektronentransports (bestimmt aus den Fluoreszenzdaten) und der CO<sub>2</sub>-Assimilation von C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Pflanzen einander gegenübergestellt, um die Rolle der Photorespiration in C<sub>3</sub>-Pflanzen zu untersuchen. Die Messungen in Abbildung 9.13 stehen in Übereinstimmung mit der bei C<sub>4</sub>-Pflanzen gefundenen direkten Korrelation des Elektronentransports und der CO<sub>2</sub>-Assimilation (Wong und Woo, 1986; Krall und Edwards, 1990), auch bei variierenden CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Konzentrationen (Oberhuber et al., 1993). Bei C<sub>3</sub>-Pflanzen konnte eine direkte Korrelation nur unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen (siehe auch Abschnitt 9.4) beobachtet werden (Wong und Woo, 1986; Cornic und Briantais, 1991). Dies trifft auch für die hier durchgeführten Vergleichsmessungen zwischen Elektronenfluß und Sauerstoffrate zu.

Ein Phänomen, das bisher in der Literatur nicht erwähnt wurde, ist bei CO<sub>2</sub>-Verarmung der Meßkammer das Auftreten eines zweiten Maximums in der Sauerstoffrate, wie es in Abbildung 9.13 B zu sehen ist. Dieses zweite Maximum trat bei den hier durchgeführten Messungen stets (mehr oder weniger stark ausgeprägt) auf. Es wird vermutet, daß seine Ursache in der Aufgabenteilung zwischen den beiden Zelltypen (Mesophyll- und Bündelscheidenzellen) liegt.

Während in den Mesophyllzellen die Hauptaufgabe in der effektiven CO<sub>2</sub>-Aufnahme be-



**Abbildung 9.13.:** Messung des Exzitonенflusses (A) und der Rate der Sauerstoffentwicklung (B) von Mais bei  $\text{CO}_2$ -Verarmung der Meßkammer. Die Intensität des aktinischen Lichts betrug  $560 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

steht, findet in den Bündelscheidenzellen der komplette Calvin-Zyklus statt (Abbildung 9.12). Das ATP, das in den Bündelscheidenzellen für den Calvin-Zyklus benötigt wird, wird hauptsächlich durch zyklischen Elektronentransport um PS I bereitgestellt. Aus diesem Grund sind die Aktivitäten der Photosysteme, PS II und PS I, in den beiden Zelltypen unterschiedlich stark ausgeprägt: Während in den Mesophyllzellen eine ähnliche Aktivität von PS II und PS I beobachtet wurde, ist in den Bündelscheidenzellen die Aktivität von PS II verglichen mit PS I sehr niedrig (Pfündel et al., 1996). Daher ist anzunehmen, daß die gemessene Sauerstoffentwicklung hauptsächlich aus den Mesophyllzellen kommt.

Vermutlich spiegelt das erste Maximum der Sauerstoffrate (Abbildung 9.13 B) den Ablauf der Photosynthese unter Normalbedingungen wider, während das zweite Maximum dadurch zustande kommt, daß die Bündelscheidenzellen bei der Verarbeitung der von den Mesophyllzellen gelieferten  $\text{CO}_2$ -Träger zeitverzögert wieder  $\text{CO}_2$  bereitstellen, das dann in

den Mesophyllzellen wieder für einen O<sub>2</sub>-Entwicklungsschub sorgt.

Bei der C<sub>4</sub>-Pflanze Mais ist eine sehr strikte Beziehung zwischen Elektronenfluß und Sauerstoffrate zu beobachten, die langsame Rückstellkomponente tritt nicht auf. Damit liefert Mais ein interessantes Gegenstück, bei dem der Export aus dem Chloroplasten offenbar eine geringere Rolle spielt. Da in den Bündelscheidenzellen, in denen der Calvin-Zyklus läuft, PS II eine geringere Rolle spielt und deshalb der zyklische Elektronentransport um PS I vorherrscht, besteht offenbar nicht die Notwendigkeit, überschüssige Reduktionsäquivalente zur Korrektur des ATP-Dilemmas (die ETC erzeugt zu wenig ATP pro NADPH) zu exportieren (Backhausen et al., 1994; Krömer, 1995; Noctor und Foyer, 1998). Dies unterstützt die Hypothese, daß die in dieser Arbeit beschriebenen Phänomene mit dem zur Lösung des ATP-Dilemmas notwendigen Redoxexport zusammenhängen.

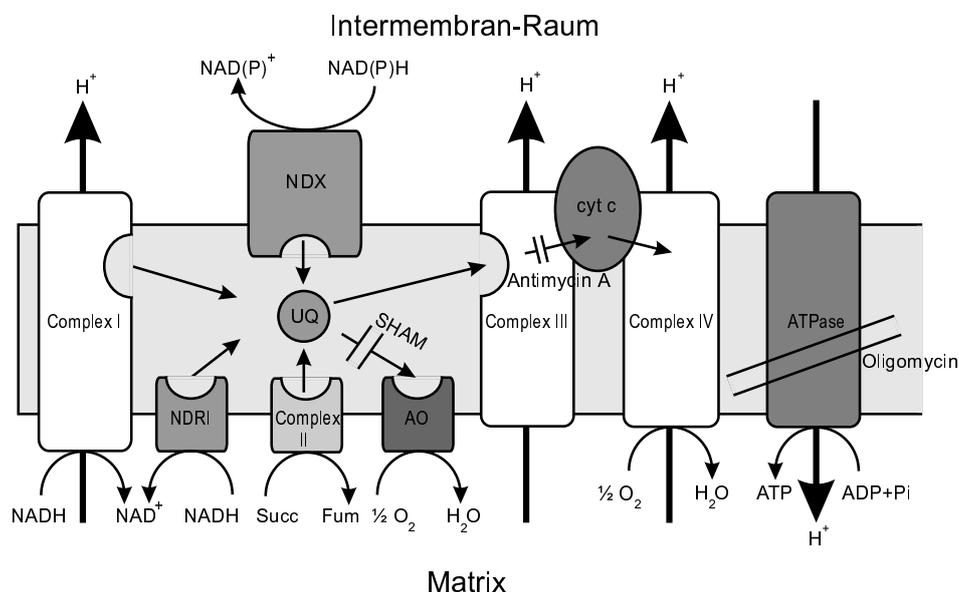
Zusammenfassend läßt sich sagen, daß in C<sub>3</sub>-Pflanzen nicht unter allen Meßbedingungen aus dem photosynthetischen Elektronenfluß (gemessen durch die Chlorophyll-Fluoreszenz) auf die CO<sub>2</sub>-Konzentration im Chloroplasten geschlossen werden kann. Vielmehr haben innerhalb der Zelle einige Prozesse große Kapazitäten, Elektronen bzw. Reduktionsäquivalente zu verbrauchen, ohne daß O<sub>2</sub> freigesetzt oder CO<sub>2</sub> assimiliert wird.

Die Kapazitäten bzw. die Stimulierbarkeit der Mitochondrienwege werden im nächsten Kapitel näher untersucht.

## 10. Versuche zur Identifikation der beteiligten mitochondrialen Wege

Im vorangegangenen Kapitel ergab sich, daß die Vorgänge in den Mitochondrien eine entscheidende Rolle bei der unterschiedlichen Streßresistenz nitrat- und ammoniumernährter Pflanzen spielen. Aus diesem Grunde wird nun versucht, durch Inhibition einzelner Wege der Atmungskette ihre Beteiligung in Abhängigkeit von der N-Form zu untersuchen. Zusätzlich zur Messung der Flüsse im Licht kommt noch die Betrachtung der lichtstimulierten (LEDR) und dunkeladaptierten Dunkelatmung hinzu, zum einen, um zu untersuchen, was im Licht im Cytosol angereichert wird, zum anderen, um zu sehen, ob die Anpassung an die Ernährungsform auch bereits die Prozesse im Dunkeln beeinflusst.

### 10.1. Inhibition mitochondrialer Funktionen



**Abbildung 10.1.:** Wirkungsorte der Inhibitoren in den Mitochondrien. Antimycin A hemmt Komplex III und damit den gesamten Cytochrom-Weg. SHAM inhibiert die Alternative Oxidase (AO), Oligomycin die ATPase.

Um, wie oben erwähnt, mögliche stickstoffspezifische Unterschiede in den metabolischen Wegen innerhalb der Mitochondrien zu finden, werden bei den Messungen Inhibitoren mitochondrialer Funktionen eingesetzt. Abbildung 10.1 zeigt die bereits in Abbildung 2.3 dargestellte mitochondriale Elektronentransportkette sowie die ATPase.

Es sind zusätzlich die Wirkungsorte der Inhibitoren Antimycin A, SHAM und Oligomycin abgebildet. Durch Antimycin A wird Komplex III und damit der gesamte Cytochrom-Weg inhibiert (Furbank und Horton, 1987; Nicholls und Ferguson, 1992), durch SHAM wird der Elektronentransport zur Alternativen Oxidase (AO) gehemmt (Siedow, 1982). Oligomycin inhibiert die mitochondriale ATPase (Igamberdiev et al., 1997, 1998).

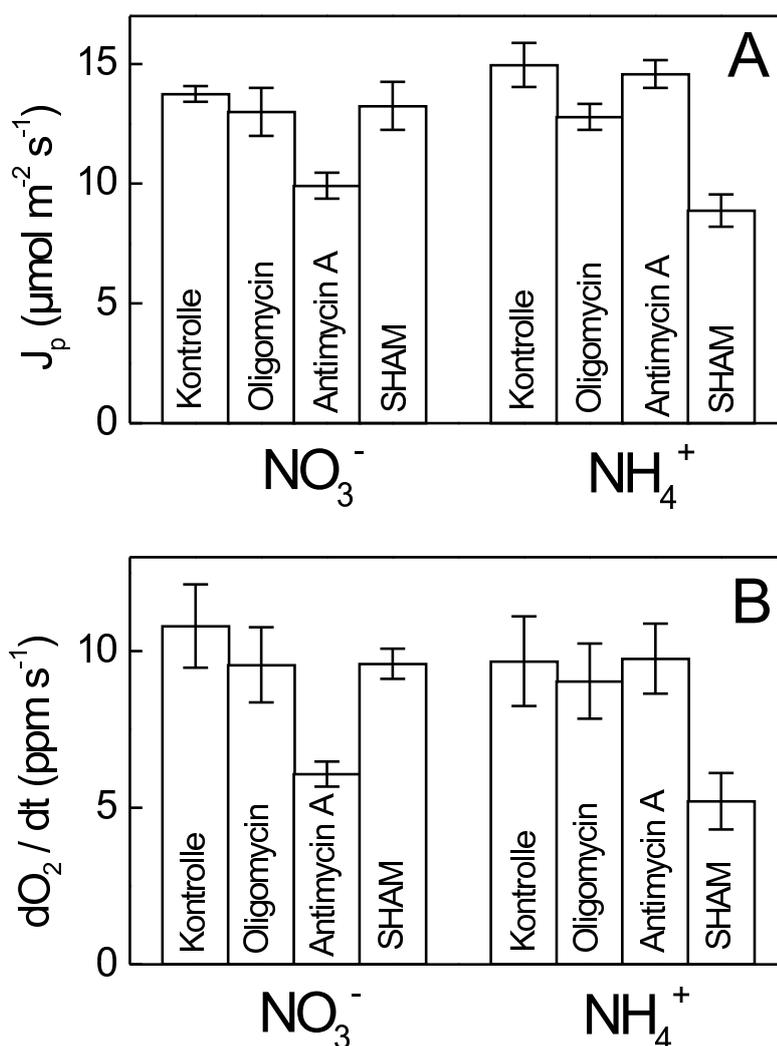
Für die Versuche wurden die abgeschnittenen Blätter der nitrat- und ammoniumernährten Buschbohnen über Nacht in die jeweilige Inhibitorlösung gestellt. Über den Transpirationsstrom gelangte der Inhibitor dann in die Zellen.

## 10.2. Auswirkungen der Inhibition auf die photosynthetischen Parameter

Bei den folgenden Messungen wurden junge nitrat- und ammoniumernährte Bohnenblätter für jeweils 5 min mit Halogenlicht von  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bestrahlt. In dieser Phase wurde mit der FC-Maschine der Elektronenfluß  $J_p$  und mit der Clark-Elektrode die Rate der Sauerstoffentwicklung  $dO_2/dt$  gemessen. Folgende Inhibitoren wurden über Nacht durch den Transpirationsstrom in die Blätter gebracht:  $10 \mu\text{M}$  Oligomycin zur Inhibition der ATPase,  $10 \mu\text{M}$  Antimycin A zur Inhibition des Cytochrom Wegs bzw.  $20 \text{mM}$  SHAM zur Inhibition der Alternativen Oxidase.

Für den Elektronenfluß  $J_p$  und die Rate der Sauerstoffentwicklung  $dO_2/dt$  ergibt sich ein sehr eindeutiges Bild (Abbildung 10.2): Die nitraternährten Pflanzen reagieren im Licht auf Antimycin A und sind gegenüber den anderen Inhibitoren unempfindlich. Die ammoniumernährten Pflanzen sind in ihren Lichtreaktionen durch SHAM beeinflusst und relativ unempfindlich gegenüber den anderen Inhibitoren (lediglich in  $J_p$  zeigte sich unter Oligomycinvergiftung eine leichte Abnahme). Eine erste Schlußfolgerung läßt sich ziehen, daß der Cytochrom Weg in den nitraternährten Pflanzen eine bedeutende Rolle spielt, während bei den ammoniumernährten Pflanzen die Alternative Oxidase wichtig für die metabolischen Reaktionen zu sein scheint. Oligomycin hat im Vergleich dazu keinen großen Effekt auf die Lichtreaktionen der beiden Pflanzenarten.

Es stellt sich die Frage, ob die Metabolite auch unmittelbar nach Ausschalten des Lichts im Cytosol zu finden sind. Dies kann durch die Messung der Light Enhanced Dark Respiration (LEDR) erfolgen.

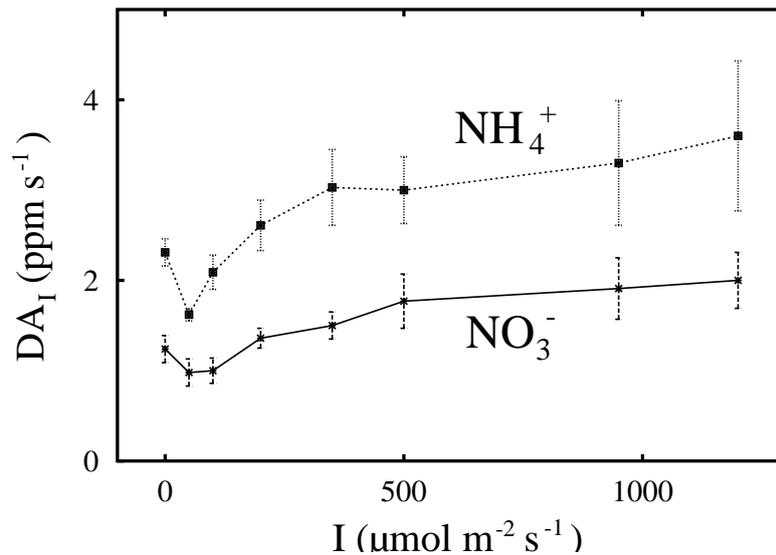


**Abbildung 10.2.:** Elektronenfluß  $J_p$  (A) und Rate der Sauerstoffentwicklung  $d\text{O}_2/\text{dt}$  (B) bei einer Aktinlichtintensität von  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblätter wurden mit Oligomycin, Antimycin A und SHAM vergiftet. Es ist der Mittelwert aus jeweils fünf Messungen dargestellt.

### 10.3. Lichtstimulierte Dunkelatmung (LEDR) in älteren Blättern

Im folgenden Abschnitt wird deshalb untersucht, inwieweit die Dunkelatmung von der unmittelbaren Vorbeleuchtung abhängt. In der Literatur gibt es unterschiedliche Aussagen und Untersuchungen darüber, wie sich die Dunkelatmung während und direkt nach Beleuchtung verhält. Da während Beleuchtung die  $\text{O}_2$ -Entwicklung an PS II im allgemeinen alle sauerstoffverbrauchenden Prozesse (Photorespiration, Dunkelatmung) überwiegt, ist es schwierig, über das Verhalten der Dunkelatmung Aussagen zu machen. Aus diesem Grund wird der Sauerstoffverbrauch in den ersten Minuten nach Ausschalten des Lichts gemessen

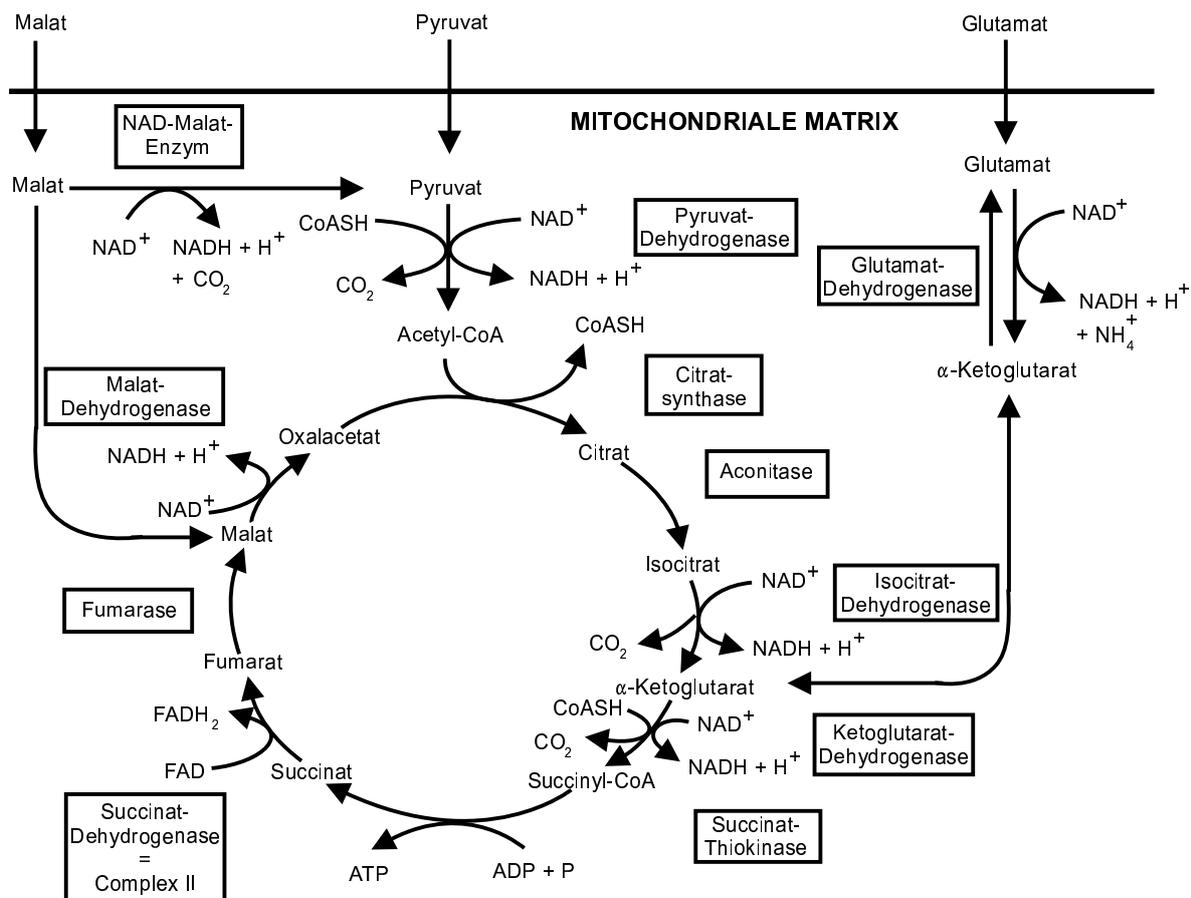
und als Maß für die vorherige Rate der Dunkelatmung genommen (Xue et al., 1996). Einige Veröffentlichungen berichten über einen Rückgang der Dunkelatmung (Edwards und Baker, 1993), während in anderen Publikationen häufig vom Phänomen der LEDR (Reddy et al., 1991; Raghavendra et al., 1994; Xue et al., 1996; Atkin et al., 1998, Hoefnagel et al., 1998) gesprochen wird.



**Abbildung 10.3.:** Rate der lichtstimulierten Dunkelatmung  $\text{DA}_I$  in Abhängigkeit von der Lichtintensität der Vorbeleuchtung in nitrat- und ammoniumernährten Blättern. Zusätzlich ist bei der Intensität  $I = 0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  der Wert der Dunkelatmung ohne Vorbeleuchtung  $\text{DA}_0$  abgebildet. Es ist der Mittelwert aus sieben Messungen dargestellt.

Im folgenden wird der Einfluß der Vorbeleuchtung bei älteren nitrat- und ammoniumernährten Blättern untersucht. Dazu wurden die ausgestanzten Blattscheiben für jeweils 10 min mit Halogenlicht von 50, 100, 200, 350, 500, 950 bzw.  $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bestrahlt. Vor der ersten Beleuchtungsphase wurden die Blattscheiben für 30 min dunkeladaptiert. In den letzten 10 min der Dunkeladaptionszeit wurde die Rate der Dunkelatmung ohne Vorbeleuchtung  $\text{DA}_0$  bestimmt. Die Rate der Dunkelatmung nach Vorbeleuchtung  $\text{DA}_I$  wurde in den ersten 5 min nach Beleuchtung gemessen (Abbildung 10.3).

Es fällt auf, daß die Dunkelatmung nach einer Beleuchtungsphase mit niedrigen Lichtintensitäten im Vergleich zur Dunkelatmung ohne Vorbeleuchtung  $\text{DA}_0$  verringert ist. Bei höheren Intensitäten nimmt die Atmung zu und erreicht höhere Werte als  $\text{DA}_0$ . Dies erklärt die oben genannte Diskrepanz in der Literatur, wenn die Messungen bei verschiedenen Lichtintensitäten durchgeführt wurden. Die Werte liegen bei den ammoniumernährten Pflanzen insgesamt höher als bei den nitraternährten Pflanzen, was mit der höheren Anzahl an Zellen pro Fläche zusammenhängt. Was bei diesen Messungen allerdings hauptsächlich interessiert, ist die Lichtabhängigkeit, die sich am Kurvenverlauf zeigt. Hierbei ist jedoch kein stickstoff-



**Abbildung 10.4.:** Schematische Darstellung des Citratzyklus. Pflanzliche Mitochondrien enthalten als Besonderheit NAD-Malat-Enzym in der mitochondrialen Matrix. Dadurch können Pflanzenmitochondrien Malat (ohne Zusatz von Pyruvat) im Citratzyklus oxidieren. Die Glutamat-Dehydrogenase ermöglicht die Oxidation von Glutamat in den Mitochondrien (Heldt, 1999).

spezifischer Unterschied zu erkennen.

Der Kurvenverlauf läßt vermuten, daß bei niedrigen Lichtintensitäten ein Herunterfahren des Citratzyklus stattfindet. Dies hängt mit der Lichtregulation der Pyruvat Dehydrogenase (PDC; Gemel und Randall, 1992; Hoefnagel et al., 1998) zusammen (Abbildung 10.4).

Diese wird im Licht inaktiviert, wodurch das Einschleusen von Pyruvat in den Citratzyklus vermindert wird. Es ist jedoch möglich, daß anstatt Pyruvat (oder zusätzlich zu Pyruvat) Malat in den Citratzyklus gebracht wird (Abbildung 10.4). Dieses Malat kann als Reduktionsäquivalent aus dem Chloroplasten exportiert worden sein. Der Import von Malat in den Citratzyklus ist daher lichtabhängig. Häusler et al. (2000) berichten, daß bei Beleuchtung der Malatgehalt im Cytosol sehr stark erhöht ist.

Ist nun bei höheren Lichtintensitäten ein Übermaß an Metaboliten in den Chloroplasten vorhanden, können diese in den Citratzyklus exportiert werden oder die Reduktionsäquivalen-

te aus ihnen den Komplex I speisen. Beides hätte als Folge eine höhere "Dunkelatmung" im Licht. Dieser Effekt ist in Abbildung 10.3 bei größer werdenden Lichtintensitäten zu beobachten.

#### 10.4. Lichtstimulierte Dunkelatmung nach Inhibition mit Oligomycin, Antimycin A und SHAM

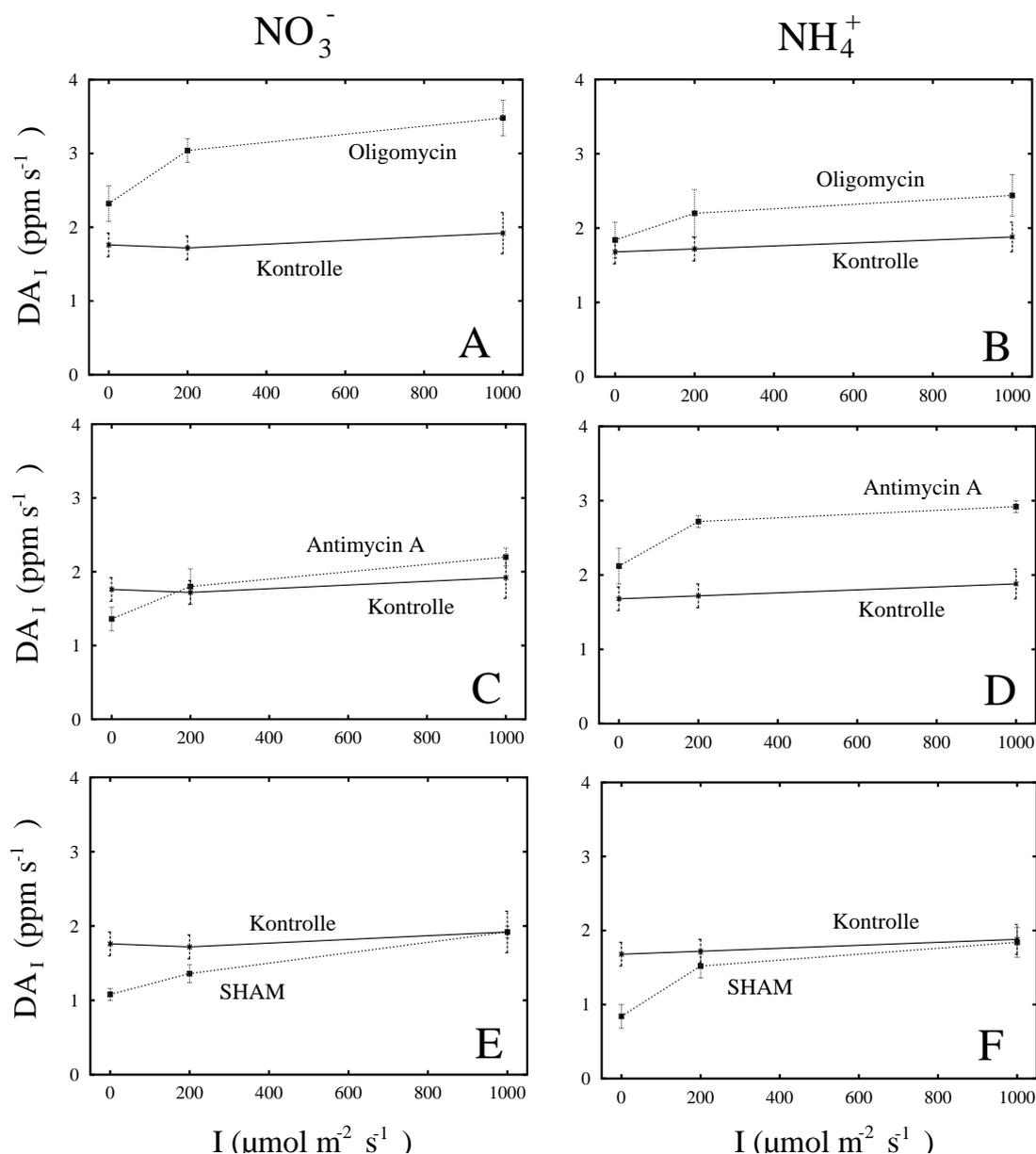
Während im Verlauf der lichtstimulierten Dunkelatmung kein stickstoffspezifischer Unterschied gefunden wurde, zeigt sich eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren. Die Inhibition wurde unter denselben Bedingungen durchgeführt wie in Abschnitt 10.2 beschrieben. Zur Untersuchung des Einflusses der Inhibitoren auf die lichtstimulierte Dunkelatmung wurden die Blattscheiben vor der ersten Beleuchtungsphase für 30 min dunkeladaptiert.

In den letzten 10 min der Dunkeladaptionszeit wurde die Rate der Dunkelatmung ohne Vorbeleuchtung  $DA_0$  bestimmt. Die Rate der Dunkelatmung nach Vorbeleuchtung  $DA_I$  wurde in den ersten 5 min nach Beleuchtung mit Halogenlicht von 200 und 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  gemessen.

Das Bild wird sehr komplex, wenn die Rate der Dunkelatmung ohne Vorbeleuchtung  $DA_0$  sowie die Rate der Dunkelatmung nach Vorbeleuchtung  $DA_I$  (Abbildung 10.5) mit der Wirkung auf die photosynthetischen Parameter aus Abschnitt 10.2 verglichen wird (Tabelle 10.1). Die Messungen mit Oligomycin (Abbildung 10.5 A, B) stützen die Hypothese, daß in nitraternährten Pflanzen die ATP-Erzeugung wichtiger ist als in ammoniumernährten Pflanzen, die in Abschnitt 10.8 näher erläutert wird.

Der Anstieg der Dunkelatmung bei Licht zeigt, daß die Elektronentransportkette in den Mitochondrien bei nitraternährten Pflanzen mit einem erhöhten Umsatz arbeiten muß, um das notwendige ATP zu erzeugen. Da bei beiden Pflanzenarten kaum ein Effekt auf die Lichtreaktionen zu erkennen ist, muß davon ausgegangen werden, daß es den nitraternährten Pflanzen gelungen ist, mit einer Stimulation der Atmung die wichtigen photosynthetischen Prozesse aufrechtzuerhalten. Bei den ammoniumernährten Pflanzen scheint diese Stimulation unter Oligomycin-Vergiftung nicht notwendig zu sein, da ebenfalls kaum eine Abnahme in den photosynthetischen Parametern zu beobachten war.

Anders verhält es sich bei Inhibition mit Antimycin A (Abbildung 10.5 C, D): Hier ist bei den nitraternährten Pflanzen keine Stimulation der Dunkelatmung zu beobachten. Als Folge davon brechen die photosynthetischen Parameter ein (Abbildung 10.2 und Tabelle 10.1). Bei den ammoniumernährten Pflanzen ist unter diesen Bedingungen eine Stimulierbarkeit der Atmung zu beobachten. Diese Stimulierbarkeit geht mit der Beobachtung einher, daß die photosynthetischen Prozesse durch den Inhibitor unbeeinflusst sind (Abbildung 10.2 und Tabelle 10.1). Affourtit et al. (2001) berichten, daß bei Antimycin A-Vergiftung 94 % der Ge-



**Abbildung 10.5.:** Rate der lichtstimulierten Dunkelatmung  $DA_I$  in Abhängigkeit von der Lichtintensität der Vorbeleuchtung. Die nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblätter wurden mit Oligomycin (A, B), Antimycin A (C, D) und SHAM (E, F) vergiftet. Zusätzlich ist bei der Intensität  $I=0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  der Wert der Dunkelatmung ohne Vorbeleuchtung  $DA_0$  abgebildet. Es ist der Mittelwert aus jeweils fünf Messungen dargestellt.

samtatmung von der Alternativen Oxidase (AO) kontrolliert werden. Wird diese Aussage auf die Messungen übertragen, so scheint die AO in nitraternährten Pflanzen nicht so stark ausgeprägt oder zumindest nicht stimulierbar zu sein. In den ammoniumernährten Pflanzen scheint eine stimulierbare AO vorhanden zu sein.

Inhibitor	hell		hell		dunkel		hell → dunkel	
	$J_p$		$dO_2/dt$		$DA_0$		$DA_I$	
	$NO_3^-$	$NH_4^+$	$NO_3^-$	$NH_4^+$	$NO_3^-$	$NH_4^+$	$NO_3^-$	$NH_4^+$
Oligomycin	-	(↓)	-	-	↑	-	↑	(↑)
Antimycin A	↓	-	↓	-	(↓)	(↑)	-	↑
SHAM	-	↓	-	↓	↓	↓	(-)	(-)

**Tabelle 10.1.:** Übersicht über die beobachteten Effekte der Inhibitoren Oligomycin, Antimycin A und SHAM auf den photosynthetischen Elektronenfluß  $J_p$ , die Rate der Sauerstoffentwicklung im Licht  $dO_2/dt$ , die Rate der Dunkelatmung ohne Vorbeleuchtung  $DA_0$  sowie die Rate der Dunkelatmung direkt nach Vorbeleuchtung  $DA_I$ . Die Symbole bedeuten: - : kein Effekt im Vergleich zur Kontrollmessung, ↑ : Erhöhung bei der Messung mit Inhibitor im Vergleich zur Kontrollmessung, ↓ : Erniedrigung bei der Messung mit Inhibitor im Vergleich zur Kontrollmessung. ( ) : die beobachtete Erhöhung oder Erniedrigung ist nur schwach ausgeprägt.

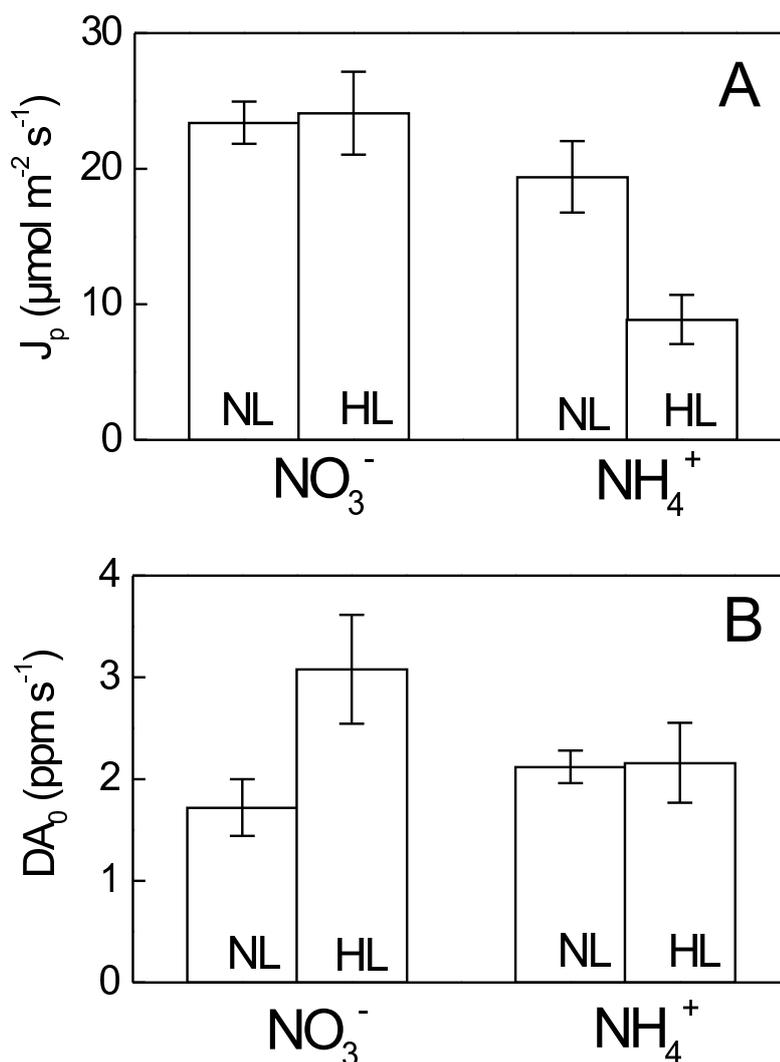
Wieder anders verhält es sich mit den Messungen unter SHAM-Vergiftung (Abbildung 10.5E, F): Hier ist zwar ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Stickstoffformen in den photosynthetischen Parametern zu sehen, aber kein Unterschied in der Lichtstimulierbarkeit der Dunkelatmung. Es ist schwierig, eine konkrete Erklärung dafür zu finden.

### 10.5. Stimulierbarkeit der Dunkelatmung bei Anzucht der Pflanzen unter Starklicht

Die Effekte in den vorangegangenen Abschnitten lassen sich mit dem Export von Metaboliten oder Reduktionsäquivalenten aus den Chloroplasten erklären. Nun soll die Frage untersucht werden, ob bei der Dunkelatmung ohne Vorbeleuchtung ( $DA_0$ ) bereits Umstellungen des metabolischen Apparates zu erkennen sind. Es muß daher die Wirkung der Anzuchtbedingungen betrachtet werden.

Wie bereits in Abbildung 7.2 dargestellt, führt die Anzucht der Pflanzen unter Starklichtbedingungen zu einem deutlichen Effekt auf die Fluoreszenzparameter bei den ammoniumernährten Pflanzen. Dies zeigt sich auch bei den in Abbildung 10.6 dargestellten Messungen. Die nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen wurden unter Normallicht (NL,  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Starklicht (HL,  $550 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen.

Für die Messungen wurden Blattscheiben ausgestanzt und in die Kammer der Clark-Elektrode gebracht. In den letzten 10 min der 30-minütigen Dunkeladaptionsphase wurde die Rate der Dunkelatmung  $DA_0$  mit der Clark-Elektrode bestimmt. Danach wurde mit der FC-Maschine bei einer Aktinlichtintensität von  $560 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und mittels sättigender Blitze der photosynthetische Elektronenfluß  $J_p$  bestimmt. Während bei den nitraternährten



**Abbildung 10.6.:** Elektronenfluß  $J_p$  (A) bei einer Aktinlichtintensität von  $560 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und Rate der Dunkelatmung  $DA_0$  ohne Vorbeleuchtung (B) in nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern, die unter Normallicht(NL)- und Starklicht(HL)-Bedingungen angezogen wurden. Es ist der Mittelwert aus jeweils vier Messungen dargestellt.

Pflanzen kein Effekt der Anzucht (NL oder HL) auf  $J_p$  zu erkennen ist, nimmt in den ammoniumernährten Pflanzen unter HL-Anzucht der Elektronenfluß ab (Abbildung 10.6 A). Umgekehrt verhält es sich mit der Dunkelatmung: Es ist kein Effekt der Anzucht (NL oder HL) bei den ammoniumernährten Pflanzen unter zu erkennen, dafür aber eine deutliche Stimulation der Dunkelatmung der nitraternährten Pflanzen (Abbildung 10.6 B).

Als Erklärungsansatz gibt es zwei Möglichkeiten:

Hypothese 1: Wie in Abbildung 7.4 gezeigt, findet unter Starklichtanzucht eine Photoinhibition bei den ammoniumernährten Pflanzen statt. Diese würde zu einem Runterregeln von PS II führen, was sich in der Verminderung von  $J_p$  äußert. Die Dunkelatmung würde daher

keine direkte Aussage über das Verhalten der Mitochondrien wiedergeben.

Hypothese 2: Es könnte sein, daß die Dunkelatmung bei den ammoniumernährten Pflanzen bereits unter Normalbedingungen in der Sättigung ist. Kommt Stress in Form von Anzucht unter Starklicht hinzu, sind die ammoniumernährten Pflanzen nicht in der Lage, zusätzliche Reduktionsäquivalente aus den Chloroplasten an die Mitochondrien abzugeben. Als Folge davon nimmt der Elektronenfluß in den Chloroplasten ab. Anders verhält es sich bei den nitraternährten Pflanzen. Ihre Dunkelatmung ist unter Stressbedingungen stimulierbar. Sie versetzt sie in die Lage, zusätzliche Reduktionsäquivalente von den Chloroplasten in die Mitochondrien zu importieren.

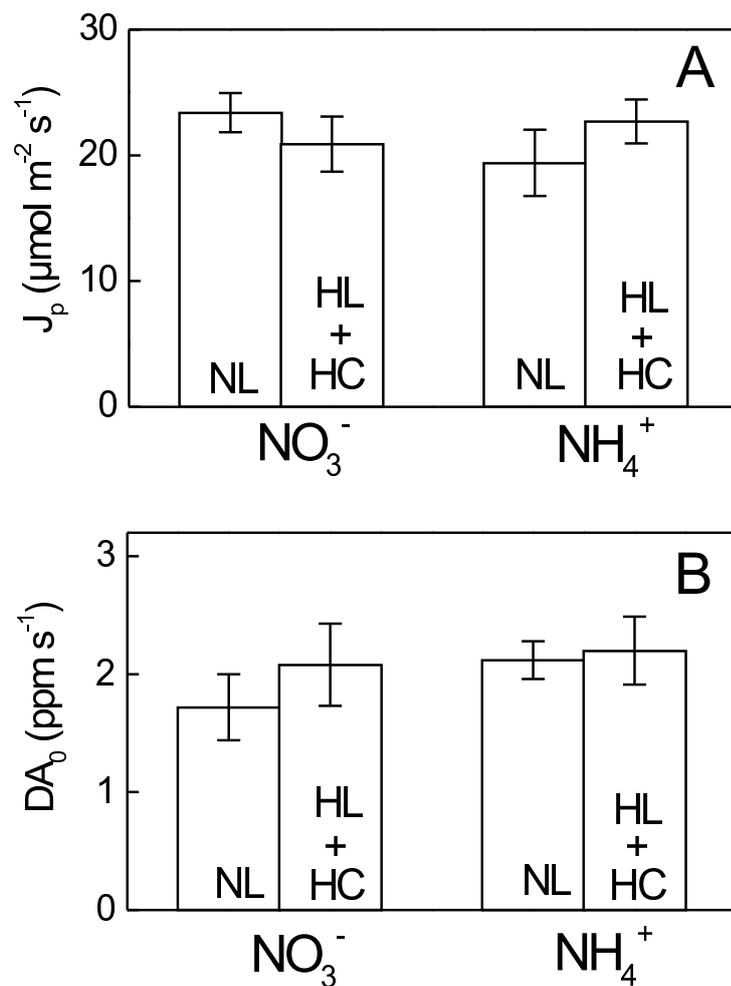
## 10.6. Dunkelatmung und Elektronenfluß bei Anzucht unter Starklicht und erhöhtem CO<sub>2</sub>-Gehalt

Da sich aus obigen Messungen keine eindeutigen Aussagen ergaben, wurde im folgenden untersucht, wie sich der Metabolismus der beiden Pflanzenarten verändert, wenn zusätzlich zum Starklicht ein erhöhter CO<sub>2</sub>-Gehalt während der Anzucht vorhanden ist. Dazu wurden die Pflanzen in einer geschlossenen Kammer im Gewächshaus bei einer Lichtintensität von  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und einem erhöhten CO<sub>2</sub>-Gehalt von 500 ppm in der Atmosphäre angezogen. Der Ablauf der Messungen ist identisch dem in Abschnitt 10.5 beschriebenen.

In Abbildung 10.7 A ist der unter einer Aktinlichtintensität von  $560 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bestimmte Elektronenfluß  $J_p$  für die bereits in Abbildung 10.6 gezeigte Kontrollmessung unter Normallicht und normaler CO<sub>2</sub>-Konzentration (NL) dargestellt. Im Vergleich dazu wurde  $J_p$  für die unter Starklicht und erhöhtem CO<sub>2</sub>-Gehalt (HL + HC) angezogenen Pflanzen bestimmt. Es fällt auf, daß die durch Starklicht hervorgerufene Beeinträchtigung des Elektronenflusses bei ammoniumernährten Pflanzen verschwindet, wenn die Anzucht unter erhöhten CO<sub>2</sub>-Konzentrationen erfolgt.

Ähnlich verhält es sich auch mit der Dunkelatmung  $DA_0$  (Abbildung 10.7 B). Hier tritt bei den nitraternährten Pflanzen nicht die in Abbildung 10.6 beobachtete Stimulierung auf.

Es scheint, als könnten die durch das Starklicht hervorgerufenen Stresserscheinungen durch den erhöhten CO<sub>2</sub>-Gehalt kompensiert werden, wahrscheinlich weil dann mehr Reduktionsäquivalente im Calvin-Zyklus verbraucht werden können (Faria et al., 1999). Die Limitierungsprozesse verschieben sich so, daß sich die Starklichtpflanzen, die unter erhöhtem CO<sub>2</sub>-Gehalt angezogen wurden, wie Pflanzen verhalten, die unter Normallicht und normalem CO<sub>2</sub>-Gehalt angezogen wurden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß die Redox-aufnehmenden Prozesse außerhalb des Chloroplasten in die Sättigung kommen können, wenn der Calvin-Zyklus nicht genug aufnimmt.

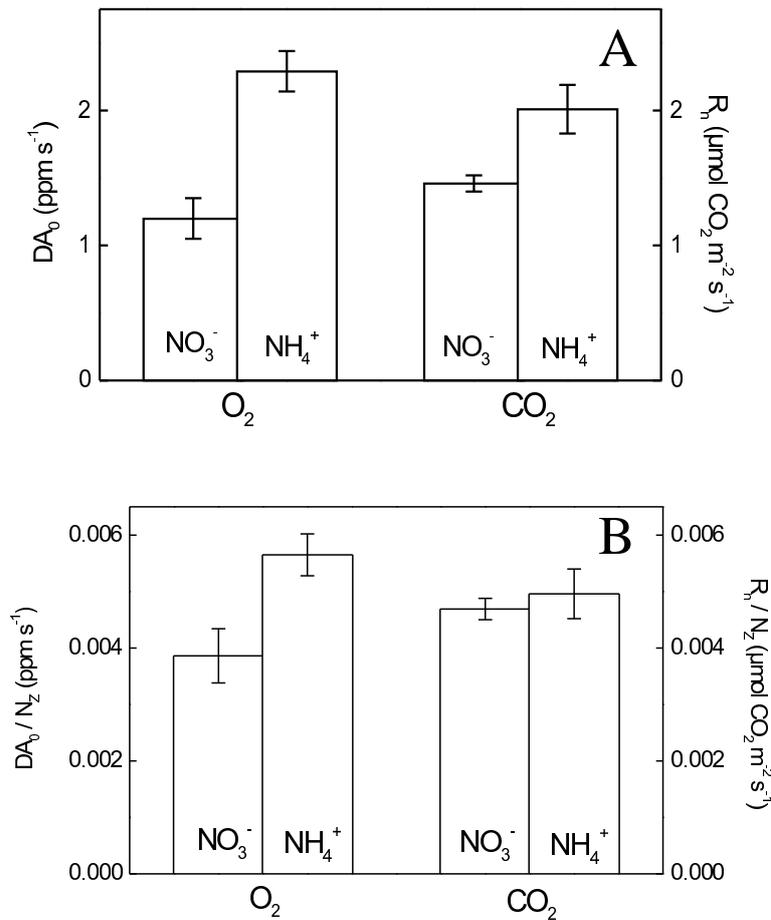


**Abbildung 10.7.:** Elektronenfluß  $J_p$  (A) bei einer Aktinlichtintensität von  $560 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und Rate der Dunkelatmung  $DA_0$  ohne Vorbeleuchtung (B) in nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern, die unter NL-Bedingungen (Normallicht von  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und Normalatmosphäre) und HL+HC-Bedingungen (Starklicht von  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und erhöhter CO<sub>2</sub>-Gehalt von 500 ppm in der Atmosphäre) angezogen wurden. Es ist der Mittelwert aus jeweils vier Messungen dargestellt.

## 10.7. Vergleich von CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Gasflüssen im Dunkeln

In dunkeladaptierten nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen wurde die Rate der O<sub>2</sub>-Aufnahme ohne vorherige Beleuchtung ( $DA_0$ ) mit der CO<sub>2</sub>-Abgabe (CO<sub>2</sub>-Dunkelatmung,  $R_n$ ) in Abbildung 10.8 A verglichen. Die Daten der CO<sub>2</sub>-Abgabe wurden der Arbeit von Guo (2001) entnommen, die Rate der O<sub>2</sub>-Aufnahme wurde mit der Clark-Elektrode (Kapitel 3.3) bestimmt. Dazu wurden die Blattscheiben für 30 min dunkeladaptiert. Für die letzten 10 min der Dunkeladaptionszeit wurde dann die Rate der O<sub>2</sub>-Aufnahme berechnet.

Es zeigt sich, daß beide Meßgrößen bei ammoniumernährten Pflanzen im Vergleich zu den

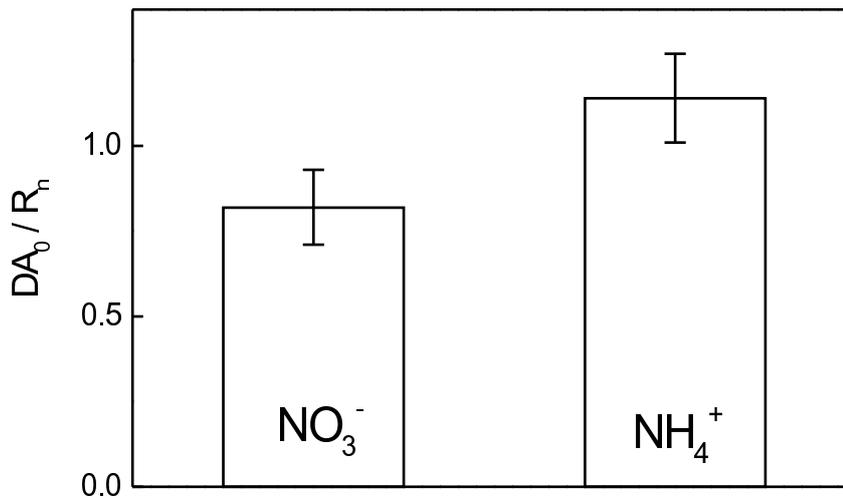


**Abbildung 10.8.:** Rate der O<sub>2</sub>-Aufnahme ohne vorherige Beleuchtung ( $DA_0$ ) und CO<sub>2</sub>-Abgabe (CO<sub>2</sub>-Dunkelatmung,  $R_n$ ) in dunkeladaptierten nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern (A). Für die Rate der O<sub>2</sub>-Aufnahme ist der Mittelwert von 20 Messungen dargestellt, die Daten der CO<sub>2</sub>-Abgabe wurden der Arbeit von Guo (2001) entnommen. (B): Die Daten aus (A) sind normiert auf die Anzahl der Zellen  $N_Z$  (Abbildung 6.4).

nitraternährten höher sind. Erneut tritt das Problem auf, daß die Gasmessungen auf die Fläche normiert sind. So kann aus den Daten in Abbildung 10.8 A nicht geschlossen werden, ob dies mit der höheren Anzahl von Zellen pro Fläche (Abbildung 6.4) oder einer tatsächlich höheren mitochondrialen Aktivität zusammenhängt.

Aus diesem Grund wurden die in Abbildung 10.8 A gezeigten Daten auf die Anzahl der Zellen pro Fläche normiert (Abbildung 10.8 B). Hieraus wird deutlich, daß die stickstoffspezifischen Unterschiede in den CO<sub>2</sub>-Flüssen verschwinden, während eine erhöhte O<sub>2</sub>-Aufnahme bei den ammoniumernährten Pflanzen auch nach der Normierung bestehen bleibt.

Eine weitere skalierungsunabhängige Aussage ergibt sich, wenn das Verhältnis der Rate der O<sub>2</sub>-Aufnahme zur CO<sub>2</sub>-Abgabe bestimmt wird (Abbildung 10.9). Hier zeigt sich, daß der Quotient bei Nitraternahrung niedriger liegt.



**Abbildung 10.9.:** Verhältnis der Rate der  $\text{O}_2$ -Aufnahme ohne vorherige Beleuchtung ( $DA_0$ ) zur  $\text{CO}_2$ -Abgabe ( $\text{CO}_2$ -Dunkelatmung,  $R_n$ , Guo (2001)) aus Abbildung 10.8 A in dunkeladaptierten nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern.

Wie schon bei den Messungen im Licht, in denen die Gesamt-Sauerstoffentwicklung pro in der Meßkammer vorhandenem  $\text{CO}_2$  bestimmt wurde (Abbildung 9.8), zeichnet sich auch bei den Reaktionen im Dunkeln ein höherer  $\text{O}_2$ -Verbrauch pro  $\text{CO}_2$ -Abgabe bei den ammoniumernährten Pflanzen ab. Allerdings ist dieser Unterschied im Dunkeln schwieriger zu interpretieren, da kein lichtabhängiger Export von Reduktionsäquivalenten stattfindet. Eine Möglichkeit besteht darin, daß Transaminasen bei nitraternährten Pflanzen auch im Dunkeln aus einfachen Aminosäuren komplexere herstellen. Dabei wird  $\text{CO}_2$  freigesetzt (Heldt, 1999).

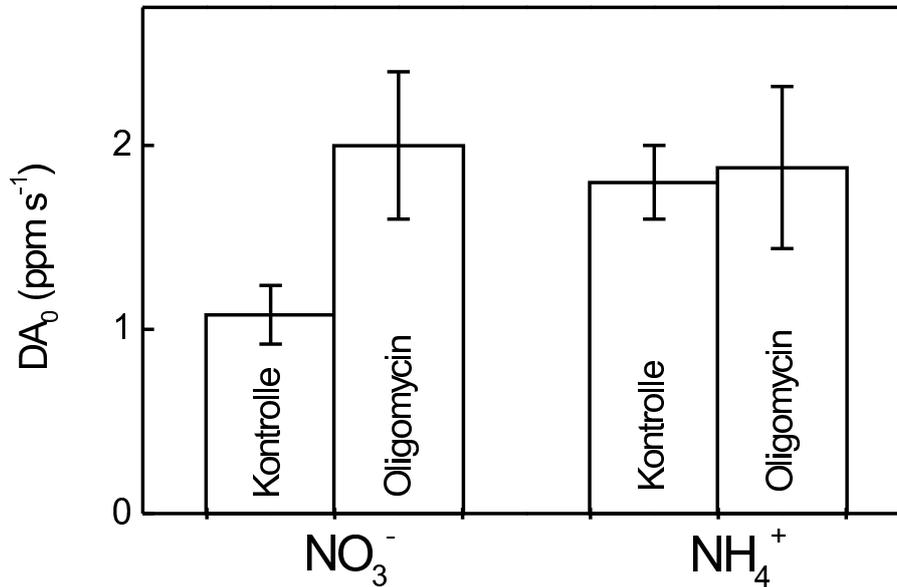
## 10.8. Dunkelatmung nach Oligomycin-Vergiftung in älteren Blättern

Wenn in nitraternährten Pflanzen auch im Dunkeln Transaminasen arbeiten, sollten diese Pflanzen stärker auf ATP angewiesen sein als die ammoniumernährten. Das wird durch Vergiftung der ATP-Synthese mit Oligomycin getestet.

Es wurde daher die Rate der Dunkelatmung  $DA_0$  bestimmt, nachdem die abgeschnittenen Blätter über Nacht mit  $10 \mu\text{M}$  Oligomycin vergiftet wurden. Wiederum wurden Blattscheiben ausgestanzt und in die Kammer der Clark-Elektrode gebracht. Die Rate der Dunkelatmung  $DA_0$  wurde in den letzten 10 min der 30 minütigen Dunkeladapionszeit mit der Clark-Elektrode bestimmt.

Abbildung 10.10 zeigt, daß kein Effekt von Oligomycin auf die Dunkelatmung in

ammoniumernährten Blättern zu beobachten ist, während bei den nitraternährten Blättern wiederum eine deutliche Stimulation zu erkennen ist.



**Abbildung 10.10.:** Rate der Dunkelatmung  $DA_0$  ohne Vorbeleuchtung in nitrat- und ammoniumernährten Bohnenblättern, die mit  $10\ \mu\text{M}$  Oligomycin vergiftet wurden. Es ist der Mittelwert aus jeweils vier Messungen dargestellt.

Die erhöhte Dunkelatmung in nitraternährten Blättern unter Oligomycin-Vergiftung läßt vermuten, daß die Atmung hier mit einem höheren Umsatz arbeiten muß, um trotz teilweiser Inhibition der ATPasen das notwendige ATP zu erzeugen. Es stellt sich die Frage, ob bei den ammoniumernährten Blättern die Dunkelatmung schon unter Normalbedingungen in der Sättigung ist (wie es bereits bei obigen Messungen unter Starklichtanzucht in Hypothese 2 vermutet wurde) oder ob die ATP-Bildung bei der Dunkelatmung in ammoniumernährten Blättern keine so große Rolle spielt wie bei den nitraternährten Blättern. Einen Hinweis auf die zweite Möglichkeit ergaben die Messungen mit SHAM in Abschnitt 10.2. Wie in der Diskussion im folgenden Kapitel noch ausgeführt wird, haben ammoniumernährte Pflanzen weniger Bedarf an ATP, da keine Stickstoffassimilation stattfindet. Im folgenden Kapitel sollen alle Ergebnisse in ein Modell eingebaut werden.

# 11. Diskussion der Ergebnisse

Aus den in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Meßergebnissen läßt sich das im folgenden diskutierte Gesamtbild als neuer Erklärungsansatz für die unterschiedliche Lichtstresstoleranz bei nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen zusammensetzen.

## 11.1. Detaillierteres Bild über die Rolle von PS II-Schädigungen

Mit Hilfe der Messungen in Kapitel 7 wurde die Adaption des Photosyntheseapparates an die jeweilige Stickstoffernährung sowie an unterschiedliche Lichtintensitäten (Schwachlicht, Starklicht) untersucht. Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

- Bei den Schwachlichtpflanzen zeigte sich kein stickstoffspezifischer Unterschied in den Quenching-Parametern  $q_p$ ,  $q_N$  und  $q_I$ . Auf den ersten Blick läßt dies vermuten, daß PS II und die damit verbundenen Lichtumwandlungsprozesse in nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen auf dieselbe Art funktionieren.
- Wird jedoch die Bildung von Zeaxanthin als zusätzliche Meßgröße in Betracht gezogen, ergibt sich, daß nitraternährte Schwachlicht-Pflanzen in der Lage sind, mehr Zeaxanthin zu bilden. Bendixen (1998) vermutete bereits, daß dies auf einen Mangel an Ascorbat in ammoniumernährten Pflanzen zurückzuführen ist.
- Die Berücksichtigung der Streszdauer in Erweiterung der Messungen von Bendixen (1998) ergab allerdings bei den Pflanzen, die unter Starklicht angezogen wurden, teilweise andere Ergebnisse. Es zeigte sich generell, daß es eine Rolle spielt, zu welchem Zeitpunkt nach Beginn der Stickstoff- und Lichtbehandlung die Messungen durchgeführt werden.
- Bei den in Abbildung 7.4 dargestellten Messungen treten stickstoffspezifische Unterschiede in der Photoinhibition bei Starklicht-Pflanzen auf. Ammoniumernährte Pflanzen sind stärker inhibiert als nitraternährte. Diese weisen jedoch auch Photoinhibitionsquenching auf, das mit einer Abnahme der Zeaxanthinantwort (im Vergleich zu nitraternährten Schwachlichtpflanzen) einher geht.

Das hier verfeinerte Bild, daß mit wachsendem Streß auch nitraternährte Pflanzen Photoinhibition und Abnahme von Zeaxanthin zeigen, ist jedoch kein Widerspruch zur alten Hypothese. Selbstverständlich sind nitraternährte Pflanzen nicht immun gegen Streß, aber es bleibt die Aussage bestehen, daß sie besser mit dem Streß fertig werden. Insbesondere zeigte sich bei diesen Messungen, daß bereits unter Nicht-Streßbedingungen Anzeichen eines unterschiedlichen Metabolismus in nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen vorhanden sind. Dies äußert sich allerdings nicht in den Fluoreszenzparametern, sondern in der mit der Radikalabwehr verbundenen Zeaxanthin-Bildung. Es stellt sich die Frage, weshalb die ammoniumernährten Pflanzen kein Zeaxanthin bilden, und welchen Mechanismus sie stattdessen entwickelt haben. Der Ascorbatmangel und die erhöhte Aktivität der Sauerstoffradikalfangenden Enzyme (Zhu et al., 2000) weisen eindeutig darauf hin, daß die ammoniumernährten Pflanzen einen stärkeren Kampf gegen Radikale führen, und daß PS II im Gegensatz zur sonst dominierenden Meinung (Aro et al., 1993; Critchley und Russel, 1994) in diesen Prozessen eine Nebenrolle spielt.

## 11.2. Hinweise auf den Export von Reduktionsäquivalenten aus den Chloroplasten

Bei hohen Lichtintensitäten entsteht im Chloroplasten ein Mißverhältnis zwischen ATP und NADPH. Beide werden für die Carboxylierung im Calvin-Zyklus gebraucht. Im Chloroplasten wird jedoch mehr NADPH erzeugt, das von der Pflanze in anderen Prozessen verbraucht werden muß. Dieses Ungleichgewicht kann sich bei hohen Lichtintensitäten vergrößern, wenn z.B. ATP zusätzlich für Proteinreparaturen benötigt wird (Baroli und Melis, 1996). Zu den NADPH verbrauchenden Reaktionen gehören die Mehler-Reaktion, die Stickstoffassimilation bei nitraternährten Pflanzen, die Photorespiration sowie der Export über den Malat-Oxalacetat-Shuttle oder den TP-PGA-Shuttle (Abbildungen 2.2 und 2.6). Reduktionsäquivalente, die aus dem Chloroplasten exportiert werden, können von den Peroxisomen oder den Mitochondrien verarbeitet werden. Die Peroxisomen sind selbst nicht in der Lage, NADH zu erzeugen, weshalb sie (vor allem unter photorespiratorischen Bedingungen) auf NADH aus anderen Zellkompartimenten angewiesen sind (Abbildung 2.5). In den Mitochondrien entstehen bereits durch den Citratzyklus Reduktionsäquivalente, die in der mitochondrialen Elektronentransportkette teilweise zur Bildung von ATP benötigt werden. Die Mitochondrien sind aber über die externe NAD(P)H-Dehydrogenase auch in der Lage, externes NAD(P)H (z.B. aus den Chloroplasten) zu verarbeiten.

Hinweise auf einen Export von Reduktionsäquivalenten aus dem Chloroplasten ergaben sich aus folgenden Messungen:

- Die schnelle Komponente ( $J_{p,shr}$ , Abbildung 9.9) im Rückstellprozeß nach einem Sättigungsblitz ging im Gegensatz zur Sauerstoffrate unter  $\text{CO}_2$ -Verarmung der Meßkam-

mer nicht auf Null zurück. Es wurde vermutet, daß die schnelle Komponente Prozesse im Chloroplasten widerspiegelt. Unter  $\text{CO}_2$ -Verarmung muß dies ein Prozeß sein, der  $\text{O}_2$  oder recyceltes  $\text{CO}_2$  verbraucht. Hierbei kommen die Photorespiration und die Mehlerreaktion in Frage. Ebenfalls könnte das GS/GOGAT-System Elektronen aufnehmen (Abbildung 2.6). Bei den FC-Messungen unter  $\text{CO}_2$ -Verarmung trat aber auch eine langsame Komponente ( $J_{p,la}$ , Abbildung 9.9) auf. Diese Komponente wird durch Prozesse verursacht, die den PQ-Pool langsam reoxidieren und daher wahrscheinlich außerhalb des Chloroplasten zu suchen sind. Die langsame Komponente trat nicht auf, solange genügend  $\text{CO}_2$  in der Kammer vorhanden war. Es zeigte sich, daß  $J_{p,la}$  unter niedrigen Aktinlichtintensitäten in der Lage war, den Anteil am photosynthetischen Elektronentransport zu übernehmen, der vor der  $\text{CO}_2$ -Verarmung für die Carboxylierung benötigt wurde.

- Die  $\text{C}_4$ -Pflanze Mais, die durch den starken zyklischen Transport um PS I in den Bündelscheidenzellen kein ATP-Problem hat, zeigt diese langsame Komponente nicht (Abbildung 9.13 A).
- Bei dem Versuch, den stickstoffspezifischen Unterschied in  $\Gamma^*$  zu erklären (Kapitel 8.2), ergab sich als wahrscheinlichste Hypothese, daß nitraternährte Pflanzen eine deutlich höhere, lichtabhängige  $\text{CO}_2$ -recyclende-Atmung ( $R_B$ ) haben als ammoniumernährte Pflanzen.
- Weitere Anzeichen für lichtabhängige Flüsse von Reduktionsäquivalenten aus dem Chloroplasten zeigten sich auch bei dem Ansatz, die Unterschiede von  $J_{E,G}$  und  $J_{E,F}$  mit einer endlichen Mesophyll-Leitfähigkeit zu erklären (Kapitel 8.3). Unter der Minimalaussage, daß die Mesophyll-Leitfähigkeit in nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen gleich groß und relativ gering ist, ergab sich ein um 15% höherer Wert des Koeffizienten  $a_1$  in nitraternährten Pflanzen. Dieser weist auf einen Anteil von  $J_{E,F}$  hin, der nicht dazu benutzt wird, den Calvin-Zyklus am Laufen zu halten. Durch andere Werte der Mesophyll-Leitfähigkeit würde sich dieser Anteil noch vergrößern.
- Besonders deutlich zeigt sich ein intensitätsabhängiger Export von Reduktionsäquivalenten bei Messungen der  $\text{O}_2$ -Dunkelatmung (LEDR) an älteren Blättern in Abhängigkeit von der vorangegangenen Beleuchtungsphase (Abbildung 10.3).
- Messungen, die mit Inhibitoren von Mitochondrienfunktionen (Antimycin A, SHAM, Oligomycin) an jungen Blättern durchgeführt wurden, ergaben von der Stickstoffform abhängige Unterschiede in der  $\text{O}_2$ -Dunkelatmung nach Vorbeleuchtung (Abbildung 10.5).

### 11.3. Mögliche Entstehungsorte für Radikale außerhalb des Chloroplasten

An obigen Ergebnissen zeigt sich, daß bei beiden Stickstoffformen ein lichtabhängiger Export von Reduktionsäquivalenten und/oder Metaboliten stattfindet. Es läßt sich nicht klar beantworten, ob der Export größer oder kleiner bei den ammoniumernährten Pflanzen ist. Dieser Aspekt ist aber für die Klärung der hier anstehenden Frage (Ursache der unterschiedlichen Schäden) weniger wichtig. Entscheidend ist die Frage nach der Art der diesen Export verarbeitenden Reaktionen, d.h. warum bei dem einen Weg mehr bösartige Radikale entstehen als bei dem anderen. Berücksichtigt werden müssen als mögliche metabolische Prozesse, die für die Entstehung der Radikale verantwortlich sind, die Photorespiration, die Nitratassimilation, der Citratzyklus sowie die verschiedenen Wege in den Mitochondrien.

- **Mitochondrien:**

- $H_2O_2$  kann in den Mitochondrien an Komplex I entstehen. Diese  $H_2O_2$ -Bildung tritt auf, wenn Komplex I nicht im Vorwärtsbetrieb läuft, z.B. bei der Oxidation von Succinat an Komplex II (Braidot et al., 1999; Casolo et al., 2000): Nach Zugabe von Succinat tritt ein rückwärtsgerichteter Elektronenfluß von UQ zu Komplex I auf. Dabei entstehen große Mengen von  $H_2O_2$ . Dieser Effekt wird vom elektrischen Potential der Membran ( $\Delta\Phi$ ) getrieben und kann durch freie Fettsäuren, die die Spannung kurzschließen, inhibiert werden. Gleichzeitig mit der  $H_2O_2$ -Entstehung an Komplex I erhöht sich die Aktivität der Alternativen Oxidase (Braidot et al., 1999; Casolo et al., 2000).
  - Wenn der Ubiquinon-Pool stark reduziert ist, können Elektronen direkt auf Sauerstoff übertragen werden, wobei Superoxid entsteht (Purvis, 1997). Diese  $H_2O_2$ -Bildung durch reduziertes UQ wird dominierend, wenn Komplex I durch Speisung mit Reduktionsäquivalenten aus Malat oder Glutamat in Vorwärtsrichtung läuft und damit das radikalerzeugende Rückwärtslaufen unterdrückt wird. Diese  $H_2O_2$ -Bildung am UQ-Pool ist nur 10 % von der an Komplex I (Braidot et al., 1999; Casolo et al., 2000). Ihr entgegen wirkt ebenfalls die Aktivierung der Alternativen Oxidase (Wagner und Krab, 1995; Popov et al., 1997; Maxwell et al., 1999).
  - Generell herrschen dann begünstigende Bedingungen für die Entstehung von Radikalen in den Mitochondrien, wenn ein niedriger Umsatz von ATP in der Zelle stattfindet (Purvis, 1997).
- **Photorespiration:** Bei der Photorespiration entsteht  $H_2O_2$  in den Peroxisomen. Allerdings werden die Peroxisomen durch Radikale langsamer geschädigt als die Mitochondrien (Jimenez et al., 1998). Die Frage ist, ob die Radikale oder  $H_2O_2$  dem Entgiftungssystem entkommen können und ins Cytosol gelangen (Del Rio et al., 1998).

- **Cytosol:** Zum Abbau von Radikalen trägt u.a. das Ascorbat-Glutathion-System, nicht nur im Chloroplasten, wie in Abbildung 4.2 gezeigt, sondern auch in den anderen Zellkompartimenten bei. Dieses Ascorbat-Glutathion-System benötigt für die Reduktion von Glutathion NADPH. Im Cytosol selbst wird jedoch kaum NADPH gebildet. Wie in Abbildung 2.6 zu erkennen ist, entsteht NADPH bei der Umwandlung von Citrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat und von TP zu PGA.

Die Bedeutung des NADPH wird durch folgende Geschichte deutlich, die im Lehnin-ger (Nelson und Cox, 2001) erwähnt wird: Pythagoras verbot seinen Anhängern den Genuß von Favabohnen, einem wichtigen Nahrungsmittel im Mittelmeerraum, wahrscheinlich deshalb, weil viele Leute davon krank wurden. Diese Erkrankung wird Favismus genannt. Ursache dafür ist ein Mangel an Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PD). G6PD katalysiert den ersten Schritt des Pentosephosphat-Weges, bei dem NADPH entsteht. Favabohnen beinhalten einen toxischen Stoff, das Divicin, durch das  $H_2O_2$  und freie Superoxid-Radikale entstehen. Bei Menschen mit G6PD-Mangel, die nur in vermindertem Ausmaß NADPH produzieren, ist die Entgiftung der Radikale beeinträchtigt. Besonders in malariadominierten Gebieten sind Menschen durch einen Gendefekt von G6PD-Mangel betroffen. Es zeigte sich, daß das Wachstum des Malaria-Erregers durch die oxidative Umgebung aufgrund des G6PD-Mangels gehemmt wird. Dadurch schützt dieser Gendefekt zwar vor Malaria, kann aber beim Verzehr von Favabohnen zum Tode führen. Für die vorliegende Arbeit bedeutet es, daß NADPH im Cytosol für die Bekämpfung von Radikalen in nitraternährten Pflanzen eine wichtige Rolle spielen kann.

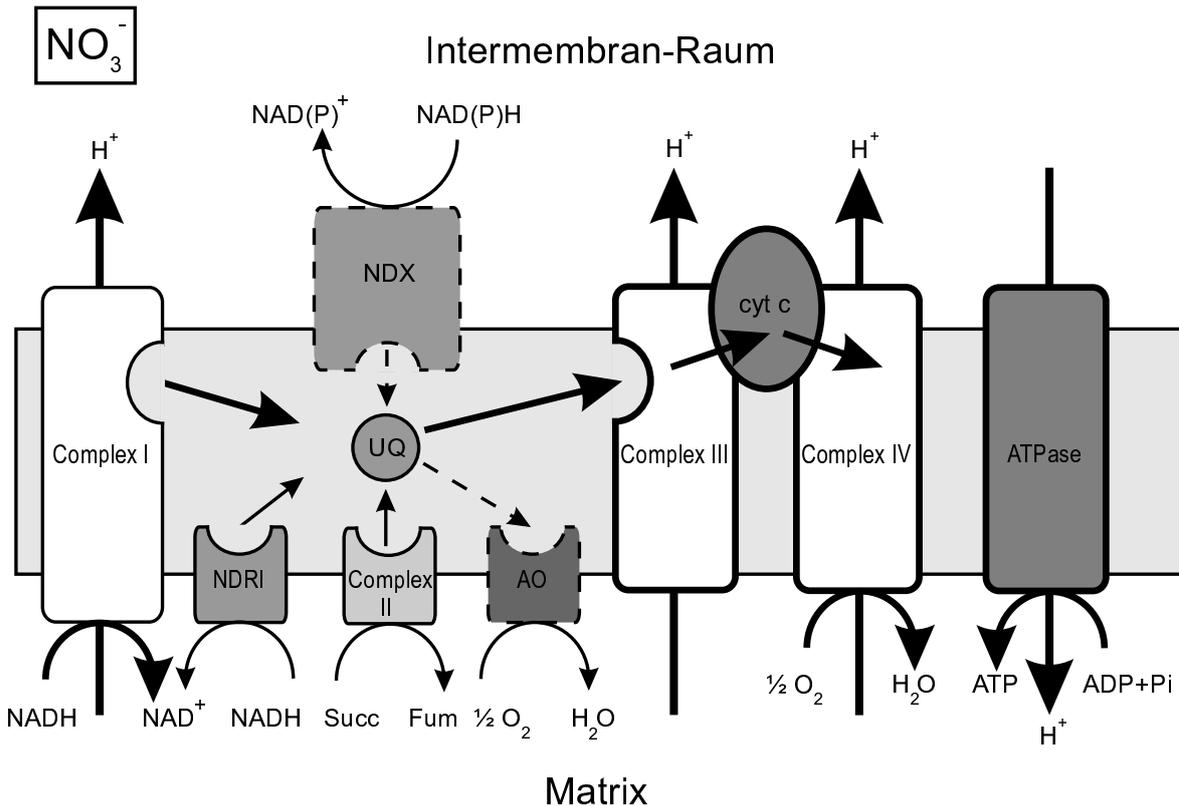
## 11.4. Identifikation der in den nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen beteiligten metabolischen Wege

- **Rolle der Photorespiration:**
  - Einen Hinweis auf photorespiratorische Aktivität ergaben die Messungen unter  $CO_2$ -Verarmung der Meßkammer: Während die Sauerstoffrate fast auf Null sank, blieb ein Teil der schnellen Komponente des Elektronenflusses bestehen (Abbildung 9.9). Es wurde angenommen, daß die schnelle Komponente Prozesse im Chloroplasten wiedergibt, die  $O_2$  verbrauchen. Bei diesen Messungen trat allerdings kein stickstoffspezifischer Unterschied auf. Wie schon mehrfach diskutiert wurde, kommt es aber nicht auf die Größe, sondern auf die Art des Exports an.
  - Beim Fitten der  $CO_2$ -Konzentration im Chloroplasten aus den Unterschieden in  $J_{E,F}$  und  $J_{E,G}$  ergaben sich  $C_C$ -Werte, die niedriger waren als die  $C_i$ -Werte, aber keine stickstoffspezifischen Unterschiede aufwiesen (Abbildung 8.4). Damit gibt

es auch keinen Hinweis auf eine unterschiedliche Photorespiration in den nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen.

• **Verschiedene metabolische Wege in den Mitochondrien:**

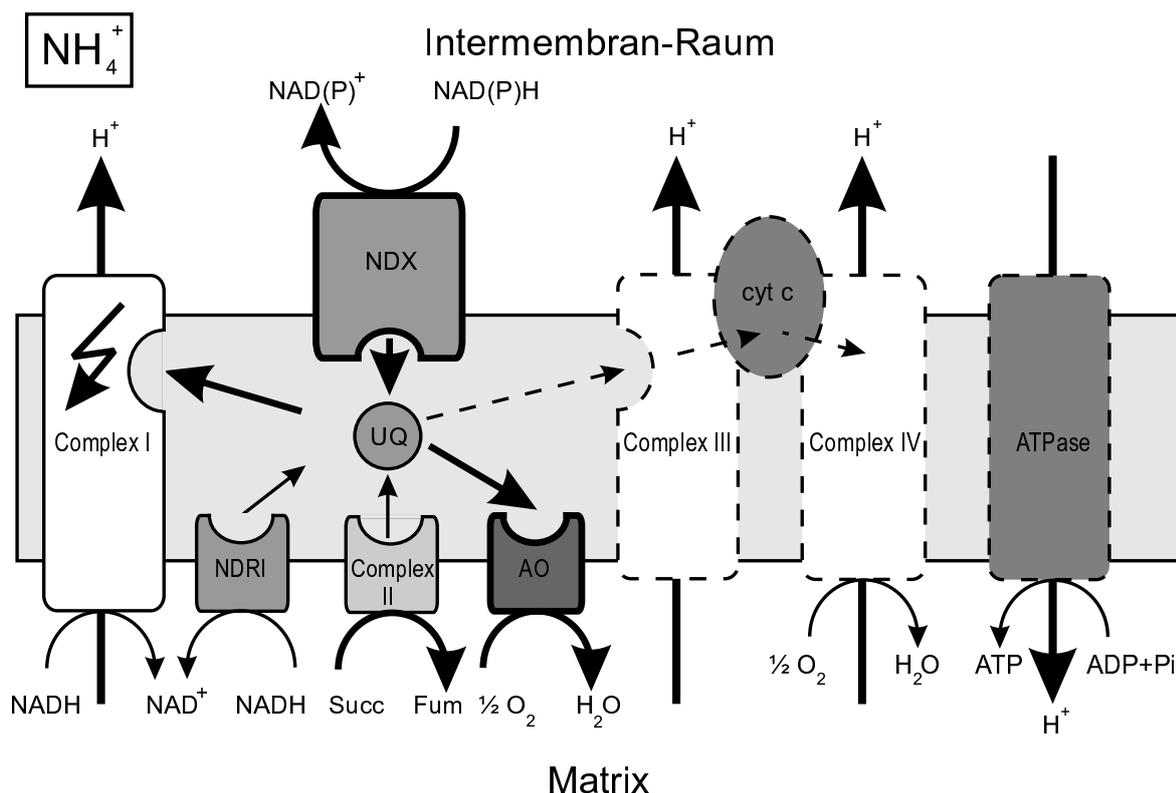
In den Abbildungen 11.1 und 11.2 ist das Bild der unterschiedlichen mitochondrialen Wege in nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen dargestellt, das sich aus den im folgenden zusammengefaßten Messungen ergab:



**Abbildung 11.1.:** Bevorzugte mitochondriale Wege in nitraternährten Pflanzen. Dicke Linien bedeuten, daß diese Reaktionen bzw. Komplexe im Vergleich zu den ammoniumernährten Pflanzen stärker ausgeprägt sind. Gestrichelte Linien deuten eine geringere Aktivität im Vergleich zu den ammoniumernährten Pflanzen an.

- An den Messungen unter Oligomycin-Vergiftung (Abbildungen 10.2, 10.5 und 10.10) zeigte sich, daß nitraternährte Pflanzen mehr ATP benötigen als ammoniumernährte. Wenn die ATPase durch Oligomycin inhibiert war, erhöhten die nitraternährten Pflanzen ihre Dunkelatmung, um durch eine erhöhte Driving Force den ATP-Bedarf mit den verbleibenden ATPasen weiterhin zu decken. Die ammoniumernährten Pflanzen waren durch die Oligomycin-Vergiftung weder in ihrem Elektronenfluß noch in der lichtabhängigen O<sub>2</sub>-Dunkelatmung signifikant beeinflusst.

- Zusammen mit der Wirkung von Antimycin A und SHAM (Abbildung 10.2) auf den Elektronenfluß und die Sauerstoffentwicklung ergibt sich, daß bei nitrater-nährten Pflanzen im Licht der Cytochrom Weg über die Komplexe III und IV eine größere Bedeutung hat. Hierbei wird an zwei Orten zum Aufbau des pH-Gradienten für die ATP-Bildung beigetragen. Bei ammoniumernährten Pflanzen spielt die Alternative Oxidase eine größere Rolle. Dabei werden keine Protonen über die Membran transportiert.



**Abbildung 11.2.:** Bevorzugte mitochondriale Wege in ammoniumernährten Pflanzen. Dicke Linien bedeuten, daß diese Reaktionen bzw. Komplexe im Vergleich zu den nitrater-nährten Pflanzen stärker ausgeprägt sind. Gestrichelte Linien deuten eine geringere Aktivität im Vergleich zu den nitrater-nährten Pflanzen an.

Es wird vermutet, daß die ammoniumernährten Pflanzen mehr Reduktionsäquivalente direkt über die externe NAD(P)H-Dehydrogenase in die Elektronentransportkette der Mitochondrien exportieren (Abbildung 11.2), während die nitrater-nährten Pflanzen unter Lichteinwirkung stärker den Komplex I nutzen (Abbildung 11.1). Dieser bezieht das NADH aus dem Malat-Oxalacetat-Shuttle oder aus der Oxidation der Kohlenstoffskelette, die in jedem Fall für die Stickstoffassimilation exportiert werden müssen (De la Torre et al., 1991; Champigny et al., 1992; Abbildungen 2.6 und 10.4). Folgende Meßergebnisse unterstützen diese Hypothese:

- Bei den Messungen unter CO<sub>2</sub>-Verarmung wurde der Quotient aus entwickeltem O<sub>2</sub> pro in der Kammer vorhandenem CO<sub>2</sub> gebildet (Abbildung 9.8). Es zeigte sich, daß entweder von den ammoniumernährten Pflanzen mehr O<sub>2</sub> verbraucht wurde oder in den nitraternährten Pflanzen Prozesse eine größere Rolle spielen, bei denen CO<sub>2</sub> entsteht. Dies könnte aus der Aminosäuresynthese stammen.
- Hypothese 2 zur Erklärung des stickstoffspezifischen Unterschieds in  $\Gamma^*$  ergab eine deutlich höhere lichtabhängige CO<sub>2</sub>-Entwicklung in den nitraternährten Pflanzen. Dieses Ergebnis führt zu einer neuen Interpretation der Ergebnisse von Häusler et al. (1999): Wenn die Phosphoenolpyruvat Carboxylase (PEPC) überexprimiert wird, kommt das Pyruvat aus der Glycolyse und muß nicht mehr aus den Chloroplasten geliefert werden. Durch diese konstante Grundversorgung wird  $R_d$  höher und  $\Gamma^*$  geringer, da kein lichtabhängiger Anteil mehr vorhanden ist.

Aufgrund obiger Überlegungen kann davon ausgegangen werden, daß bei den nitraternährten Pflanzen Komplex I stärker dazu benötigt wird, Reduktionsäquivalente aus Wegen, die für die Stickstoffassimilation verwendet werden, zu gewinnen (Abbildung 11.1).

Die hohe Radikalerzeugung bei den ammoniumernährten Pflanzen läßt sich erklären, wenn die Oxidation des Ubiquinon-Pools nicht über Komplex I geschieht (Abbildung 11.2). Es gibt dafür mehrere Mechanismen: Zu diskutieren sind die Succinat-Fumerat-Reaktion am Komplex II (aus dem Citratzyklus, Abbildungen 10.4 und 11.2) und die Oxidation des cytosolischen NAD(P)H mit der externen Reduktase (Abbildung 11.2). Hierzu paßt, daß das Einschalten der Alternativen Oxidase (SHAM-Empfindlichkeit in Abbildung 10.2) und die relative Unempfindlichkeit gegen Oligomycin (Abbildung 10.2) zeigt, daß bei ammoniumernährten Pflanzen nur geringe Syntheseleistungen im Cytosol ablaufen.

Die Chloroplasten werden also weniger Malat oder Triosephosphate exportieren, sondern als Stärke im Chloroplasten ablagern. Dies ist tatsächlich der Fall, da die Blätter ammoniumernährter Pflanzen mehr Stärke enthalten (Guo, pers. Mitteilung).

Durch den Wegfall des Exports von Kohlenwasserstoffen, der zur Speisung von Komplex I verwendet werden kann, müssen die Reduktionsäquivalente (z.B. über den Malat-Oxalacetat-Shuttle) direkt an die externe NAD(P)H-Dehydrogenase geliefert werden, um UQ zu reduzieren. Der dann kaum benutzte Komplex I würde rückwärts laufen und Radikale erzeugen (Braidot et al., 1999; Casolo et al., 2000).

Eine weitere Vermutung ist, daß sich ein Stau von Pyruvat und anderen C3- oder C4-Körpern (Malat, Oxalacetat) bildet, weil kein  $\alpha$ -Ketoglutarat für die Glutamat-Synthese aus dem Citratzyklus entnommen wird (Abbildung 10.4). Dies würde zu einer Fütterung von Komplex II mit Succinat führen und damit auch zum Rückwärtslaufen von Komplex I (Braidot et al., 1999; Casolo et al., 2000). Dagegen spricht, daß somit viel CO<sub>2</sub> im Citratzyklus freigesetzt würde (was den Ergebnissen in Abbildung 9.8 widerspricht) und auch nicht mehr die hohe Stärke-Ablagerung in den Chloroplasten erklären würde.

Gegen dieses Modell spricht auch, daß der Citratzyklus im Licht inhibiert wird. Die Messung der LEDR in Abbildung 10.3 zeigt aber, daß dieses Bild möglicherweise dahingehend verfeinert werden muß, daß nur ein Teil des Citrat-Zyklus bis zum Export des Citrats oder  $\alpha$ -Ketoglutarats (Abbildung 10.4) läuft. Das bessere Gegenargument ist sicher, daß in ammoniumernährten Pflanzen eine schwächere  $\text{CO}_2$ -Entwicklung beobachtet wird (Abbildung 9.8) als in nitraternährten Pflanzen.

Verglichen mit der Hypothese aus der vorangegangenen Diplomarbeit (Kapitel 4.1.4), bei der zwei Gruppen von PS I-Akzeptoren vermutet wurden, die sich in ihrer Stimulierbarkeit unterscheiden, zeigt sich hier, daß sich das Interesse von den Chloroplasten in die Mitochondrien verlagern muß. Auch in den Mitochondrien herrschen von den nitrat- und den ammoniumernährten Pflanzen unterschiedlich favorisierte Wege vor (Abbildungen 11.1 und 11.2). Der Effekt von Antimycin A in den nitraternährten Pflanzen, der in der Diplomarbeit dem zyklischen Transport um PS I zugeschrieben wurde, wird wahrscheinlich durch den Cytochrom Weg in den Mitochondrien verursacht. Deren Versorgung erfolgt vornehmlich durch den Export über den Malat-Oxalacetat-Shuttle.

Bei den ammoniumernährten Pflanzen übernimmt die externe NAD(P)H-Dehydrogenase die Rolle des Verursachers der Radikale, die der Mehlerreaktion in der Diplomarbeit zugeschrieben wurde: Da der Hauptfluß von Reduktionsäquivalenten über die externe NAD(P)H-Dehydrogenase läuft, findet ein rückwärtsgerichteter Elektronenfluß zu Komplex I statt, was die Entstehung von Radikalen fördert. Die Stimulierung bei Vergiftung mit Glycerinaldehyd legt nahe, daß bei den ammoniumernährten Pflanzen ebenfalls mehr Reduktionsäquivalente über den Malat-Oxalacetat-Shuttle exportiert werden. Dieser Weg ist offenbar stärker stimulierbar als der Export von reinen Reduktionsäquivalenten.

## 12. Fazit und Ausblick

Wie am Ende des vorherigen Kapitels ausgeführt wird, gewinnt die Hypothese über die unterschiedliche Resistenz von nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen deutliche Konturen. Dabei hat sich das Konzept aus der vorangegangenen Diplomarbeit als bereits richtungsggebend erwiesen. Das Schwergewicht der Erklärung hat sich durch die neuen Erkenntnisse dieser Arbeit auf unterschiedliche Wege in den Mitochondrien verlagert. Dabei ist bei den nitraternährten Pflanzen durch Verwendung von Komplex I ein weniger gefährlicher Weg involviert, während die Verbrennung überschüssiger Reduktionsäquivalente über die externe NAD(P)H-Dehydrogenase ein stark radikalerzeugendes Rückwärtslaufen des schwach ausgelasteten Komplexes I bei ammoniumernährten Pflanzen nicht vermeiden kann. Es erfolgt aber ein Austausch sehr ähnlicher Prozesse: Die Mehler-Reaktion wird gegen die externe NAD(P)H-Dehydrogenase getauscht, der Export wird auf den Export von Metaboliten eingeschränkt, der zyklische Transport über das Cytochrom in den Chloroplasten wird durch den Cytochromweg in den Mitochondrien ersetzt.

Obwohl obige Aspekte stark auf biochemische Fragestellungen zielen, hat die Verbesserung der physikalisch/physiologischen Ansätze (FC-Maschine, modellgestützte Auswertung der Gasmessungen) sehr zum Verständnis der Prozesse beigetragen. Der Vorteil dieser Methoden ist die Messung am intakten System, während biochemische Ansätze das System nicht *in vivo* betrachten. Das Problem bei der Weiterführung der Untersuchungen ist aber das Fehlen weiterer guter, physikalischer Meßtechniken.

Ein Ansatz, der zur Zeit in der Dissertation von Hammes begonnen wird, ist die kinetische Untersuchung der Wirkung der Gasmodulation. Hierbei wird der CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Partialdruck moduliert und die Wirkung auf die Chlorophyll-Fluoreszenz untersucht. Die Idee hinter diesem Ansatz ist folgende: Sowohl die Modulation mit O<sub>2</sub> (Oxygenase) als auch mit CO<sub>2</sub> (Carboxylase) wird den Elektronenfluß durch die ETC und durch den ATP-Verbrauch die Thylakoid-Energetisierung verändern (Hansen et al., 1993).

Wenn die beiden Gase nun gleichzeitig, aber gegenphasig, moduliert werden, gibt es ein Amplitudenverhältnis, bei dem sich die Wirkungen gegenseitig aufheben. Falls nur der Calvin-Zyklus als Elektronenakzeptor auftritt, sollte das gleiche Verhältnis einen Null-Effekt auf die Chlorophyll-Fluoreszenz und Thylakoid-Energetisierung ergeben. Sind andere Elektronenakzeptoren mit einer anderen Stöchiometrie des ATP-Verbrauchs (Redoxexport in die Mi-

---

tochondrien oder Mehler-Reaktion) beteiligt, werden die Kompensationspunkte für beide Signale verschieden sein. Der Unterschied zwischen Saugwirkung auf die ETC und Abbau der Thylakoid-Energetisierung kann aus dem Verhältnis von photochemischem Quenching und Energy-Quenching oder aus der kinetischen Analyse der Chlorophyll-Fluoreszenz bestimmt werden. Außerdem wäre in dem Fall, daß ausschließlich der Calvin-Zyklus beteiligt ist, der Kompensationsquotient unabhängig von der Frequenz der Modulation, im anderen Fall jedoch nicht. Hierbei ergibt sich für die FC-Methode ein optimales Einsatzgebiet, da Fluoreszenzänderungen hervorgerufen durch die Gasmodulation unmittelbar, ohne Inversion, beobachtet werden können. Die kinetische Analyse ermöglicht eine Trennung der Effekte durch die Berücksichtigung des Zeitverhaltens, ähnlich wie bereits bei der langsamen Rückstellkomponente (Abbildung 9.3 A) im FC-Signal.

Trotz dieser neuen Methode wird der Hauptdurchbruch wahrscheinlich nur mit biochemischen Methoden zu erzielen sein. Hier haben sich in Kiel zwei neue Voraussetzungen ergeben. Zum einen ermöglicht das ZBM (Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie) das Screenen von eingeschalteten Enzymen mit hoher Durchsatzrate. Zum anderen ergibt sich eine Kooperationsmöglichkeit mit dem neu in die Botanik berufenen Prof. Kempken, der das Einschalten der Genexpression mitochondrialer Enzyme unter Stress untersucht.

Die Fortführung der Arbeiten wird einen zusätzlichen Schwerpunkt erhalten. Die bereits genannte Dissertation von Hammes gehört zu einem neuen DFG-Projekt in Kooperation mit dem Institut für Phytopathologie (AG Verreet), bei der es um die Erkennung von Pilzbefall durch Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen vom fahrenden Trecker geht. Pilzbefallene Pflanzen verhalten sich ähnlich wie ammoniumernährte. Während die ammoniumernährten Pflanzen Radikale "als technischen Fehler" erzeugen, nutzen pathogene Pflanzen die Radikale zur Abwehr gegen die Pilze.

Bei Pilzbefall der Pflanzen zeigt sich eine über die Chlorophyll-Fluoreszenz gemessene Reduzierung der photosynthetischen Aktivität (Raggi, 1995), die mit einer Stimulation der Respiration einhergeht (Raggi, 1995). Ähnlich zum Verhalten der ammoniumernährten Pflanzen fällt bei Pilzinfektion das Antennen-Xanthophyll Zeaxanthin (Levall und Bornman, 2000). Eine Erniedrigung des Ascorbatgehalts wurde ebenfalls beobachtet (Jakob et al., 1997). Zusätzlich lösen sich Peroxisomen teilweise von den Chloroplasten und Mitochondrien, um sich am Plasmalemma zu versammeln, offenbar um Radikale zur Abwehr zu liefern (Coulomb et al., 1996). Es muß allerdings untersucht werden, ob die Mechanismen, die diesen Ergebnissen zugrunde liegen, ähnlich den im Stickstoffprojekt gefundenen sind.

So kann die physiologische Bedeutung der jeweiligen Effekte bei N-Form-Anpassung und Pilzbefall verschieden sein. In der dieser Arbeit zugrundeliegenden Hypothese hängt die Art der Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung an den Erfordernissen einer ausgewogenen ATP/NAD(P)H-Bilanz sowie der Bereitstellung von Kohlenstoffskeletten für die Protein Synthese. Bei Pilzbefall kann die Ursache für ähnliche meßtechnische Befunde die Aktivierung der Radikalerzeugung zur Pathogenabwehr oder eine vom Pathogen stimulierte Be-

reitstellung von Biomasse (Respiration) sein. Die Vermutung der Ähnlichkeit zu den Fragestellungen des Stickstoffprojekts wird dadurch gestützt, daß die mehr Radikale erzeugenden ammoniumernährten Pflanzen resistenter gegen Pilzbefall sind (Cruz et al., 1993).

Aufgrund der Ähnlichkeiten wird auf eine wechselseitige Stimulierung zwischen dem Stickstoff- und dem Pilzprojekt gehofft. Die Ergebnisse dieser Arbeit stecken den Rahmen ab, in dem die Weiterführung laufen muß.

## 13. Zusammenfassung

In dieser Arbeit kristallisierte sich heraus, daß bei der Untersuchung der stickstoffspezifischen Lichtstreßresistenz das Interesse von den Chloroplasten zu den Mitochondrien und den Interaktionen zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten verlagert werden muß. So ergaben sich aufgrund der Messungen zahlreiche Hinweise, daß die Ursachen für die höhere Lipidperoxidation sowie die stärkere Radikalabwehr in ammoniumernährten Pflanzen nicht in den Chloroplasten bei der Mehler-Reaktion, sondern in den Mitochondrien an Komplex I zu vermuten zu sind.

Es ergab sich folgendes Modell: Wenn Komplex I nur schwach ausgelastet ist, wie das bei den ammoniumernährten Pflanzen aufgrund der Verbrennung überschüssiger Reduktionsäquivalente über die externe NAD(P)H-Dehydrogenase der Fall ist, tritt ein rückwärtsgerichteter Elektronenfluß vom Ubiquinon-Pool zu Komplex I auf. Dieser ist mit einer sehr starken Radikalerzeugung verbunden. Bei den nitraternährten Pflanzen hingegen wird Komplex I durch die stärkere Bereitstellung von Metaboliten zur Aminosäuresynthese im Vorwärtsbetrieb genutzt, was das radikalerzeugende Rückwärtslaufen verhindert. Die wichtigsten Ergebnisse, auf die sich die Modellkonstruktion stützt, sollen im folgenden zusammengefaßt dargestellt werden.

Bei den Messungen ergaben sich zunächst deutliche Hinweise auf einen Redox-Export aus den Chloroplasten:

- Das Auftreten der langsamen Komponente bei den FC-Messungen unter CO<sub>2</sub>-Verarmung ließ vermuten, daß unter niedrigen Aktinlichtintensitäten Prozesse außerhalb des Chloroplasten in der Lage waren, den Anteil am photosynthetischen Elektronentransport zu übernehmen, der vor der CO<sub>2</sub>-Verarmung für die Carboxylierung benötigt wurde.
- Diese Vermutung wurde gestützt durch Messungen an der C<sub>4</sub>-Pflanze Mais, die durch den starken zyklischen Transport um PS I in den Bündelscheidenzellen kein ATP-Problem hat: Hier trat diese langsame Komponente nicht auf.
- Besonders deutlich zeigte sich ein intensitätsabhängiger Export von Reduktionsäquivalenten bei Messungen der O<sub>2</sub>-Dunkelatmung (LEDR) in Abhängigkeit von der vorangegangenen Beleuchtungsphase.

- Messungen, die mit Inhibitoren von Mitochondrienfunktionen (Antimycin A, SHAM und Oligomycin) durchgeführt wurden, ergaben von der Stickstoffform abhängige Unterschiede in der O<sub>2</sub>-Dunkelatmung nach Vorbeleuchtung.
- Ein weiteres Anzeichen für lichtabhängige Flüsse von Reduktionsäquivalenten aus dem Chloroplasten zeigte sich auch bei der modellgestützten Auswertung der Unterschiede von  $J_{E,G}$  und  $J_{E,F}$  bei Annahme einer endlichen Mesophyll-Leitfähigkeit. Unter der Bedingung, daß die Mesophyll-Leitfähigkeit in nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen gleichgroß ist, ergab sich ein um 15 % höherer Wert des Koeffizienten  $a_1$  in nitraternährten Pflanzen. Dieser weist auf einen Anteil am photosynthetischen Elektronenfluß  $J_{E,F}$  hin, der nicht in den Calvin-Zyklus fließt.

Als weiteres Indiz für die oben dargestellten unterschiedlichen mitochondrialen Wege trat bei den ammoniumernährten Pflanzen ein stärkerer Sauerstoffverbrauch pro vorhandenem bzw. freigesetztem CO<sub>2</sub> auf:

- Bei den Messungen unter CO<sub>2</sub>-Verarmung wurde der Quotient aus entwickeltem O<sub>2</sub> pro in der Kammer vorhandenem CO<sub>2</sub> gebildet. Dieser war bei ammoniumernährten Pflanzen eindeutig geringer, was darauf schließen ließ, daß entweder von den ammoniumernährten Pflanzen mehr O<sub>2</sub> verbraucht wurde oder in den nitraternährten Pflanzen Prozesse eine größere Rolle spielen, bei denen CO<sub>2</sub> entsteht. Dieses CO<sub>2</sub> könnte bei den nitraternährten Pflanzen aus der Aminosäuresynthese stammen.
- Bei den Überlegungen, die stickstoffspezifischen Unterschiede in  $\Gamma^*$  zu erklären, ergab sich als wahrscheinlichste Hypothese eine deutlich höhere lichtabhängige CO<sub>2</sub>-Entwicklung in den nitraternährten Pflanzen.

Den deutlichsten Hinweis für die unterschiedliche Auslastung der Mitochondrien in nitrat- und ammoniumernährten Pflanzen gaben die Messungen mit den Mitochondrien-Inhibitoren Antimycin A, SHAM und Oligomycin:

- An den Messungen unter Oligomycin-Vergiftung zeigte sich, daß nitraternährte Pflanzen mehr ATP benötigen als ammoniumernährte. Wenn die ATPase durch Oligomycin inhibiert war, erhöhten die nitraternährten Pflanzen ihre Dunkelatemung. Dies zeigte, daß die Atmung hier mit einem höheren Umsatz arbeiten muß, um trotz teilweiser Inhibition der ATPasen das notwendige ATP zu erzeugen, während die ammoniumernährten Pflanzen durch die Oligomycin-Vergiftung kaum beeinflusst waren.
- In Verbindung mit der Wirkung von Antimycin A und SHAM auf den Elektronenfluß und die Sauerstoffentwicklung ergab sich, daß bei nitraternährten Pflanzen im Licht der Cytochrom Weg über die Komplexe III und IV eine größere Bedeutung hat. Hierbei wird mit zwei verschiedenen Mechanismen zum Aufbau des pH-Gradienten für

---

die ATP-Bildung beigetragen. Bei ammoniumernährten Pflanzen spielt die Alternative Oxidase eine größere Rolle. Dabei werden keine Protonen über die Membran transportiert. Die Alternative Oxidase wird jedoch bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Entstehung eingeschaltet.

Die Hinweise auf einen starken Export von Metaboliten und/oder Reduktionsäquivalenten aus den Chloroplasten in Verbindung mit dem höheren Sauerstoffverbrauch pro vorhandenem bzw. freigesetztem  $\text{CO}_2$  bei ammoniumernährten Pflanzen und der unterschiedlichen Wirkung der Mitochondrien-Inhibitoren auf die Lichtreaktionen führten schließlich zu oben skizzierten Gesamtbild der verschiedenen Wege in den Mitochondrien.

# A. Theoretischer Hintergrund der FC-Maschine

Bereits in den Vorgängerarbeiten (Giannikos, 1995; Schinner, 1997) wurde eine theoretische Grundlage für die Interpretation der Flußmessungen und ihre möglichen Vorteile gegenüber den bisherigen Fluoreszenzmessungen geschaffen. Fundiertere Betrachtungen (Schinner et al., 2000) erfolgten im Rahmen dieser Arbeit.

## A.1. FC-Fluß als Summe photochemischer und thermischer Flüsse unabhängig vom Modell des Energieaustauschs zwischen den PS II-Reaktionszentren

Im folgenden wird von  $N$  miteinander verbundenen PS II Reaktionszentren ausgegangen, die ihre Anregungsenergie mit der Ratenkonstante  $p$  austauschen können. Für diesen Energieaustausch gibt es zwei Spezialfälle: das Separate-Unit-Modell ( $p=0$ ), bei dem kein Anregungsenergietransfer stattfindet, und das Matrixmodell ( $p \rightarrow \infty$ ), das von einem sehr schnellen Anregungsenergietransfer ausgeht.

Diese  $N$  Reaktionszentren beinhalten  $n_0$  offene Zentren mit dem Exzitonlevel  $C_0$  und  $n_c$  geschlossene Zentren mit dem Exzitonlevel  $C_c$ . Der Absorptionsquerschnitt von offenen und geschlossenen Reaktionszentren ist gleich ( $a_c = a_o = a$ ). Für ein einzelnes, offenes Reaktionszentrum mit dem Absorptionsquerschnitt  $a$  gilt folgendes Flußgleichgewicht (Dau, 1994):

$$(k_1 + k_t + k_f + k_s + p \frac{N-1}{N}) C_0 = a I + p C_c \frac{n_c}{N} + p C_0 \frac{n_0-1}{N} \quad (\text{A.1})$$

wobei  $k_f$  die Ratenkonstante der Fluoreszenz,  
 $k_t$  die Ratenkonstante der thermischen Deaktivierung,  
 $k_s$  die Ratenkonstante für den Spillover zu PS I,  
 $k_1$  die Ratenkonstante für den Netto-Fluß von Exzitonen in die Reaktionszentren  
 $I$  die eingestrahlte Lichtintensität ist.

Eine ähnliche Gleichung gilt für die geschlossenen Reaktionszentren. Der einzige Unter-

schied besteht darin, daß es keinen Fluß in die Reaktionszentren gibt ( $k_1 = 0$ ):

$$(k_t + k_f + k_s + p \frac{N-1}{N}) C_c = a I + p C_0 \frac{n_0}{N} + p C_c \frac{n_c - 1}{N} \quad (\text{A.2})$$

Folgende Abkürzung werden bei den weiteren Rechnungen benützt:

$$k_d = k_t + k_f + k_s \quad (\text{A.3})$$

$$Q = \frac{n_c}{N} \quad \text{und} \quad 1 - Q = \frac{n_0}{N} \quad (\text{A.4})$$

Die Umformung und Verknüpfung der Gleichungen A.1 und A.2 ergibt das Verhältnis der Exzitonlevel in den offenen zu den geschlossenen Zentren:

$$\frac{C_0}{C_c} = \frac{k_d + p}{k_d + k_1 + p} \quad (\text{A.5})$$

Das eingestrahelte Licht wird von  $n_c = NQ$  geschlossenen Reaktionszentren und  $n_0 = N(1 - Q)$  offenen Reaktionszentren absorbiert. Folglich ergibt sich für den Gesamtfluß  $J_a = a I$ :

$$J_a = N(1 - Q) a I + N Q a I \quad (\text{A.6})$$

Die Flüsse in die offenen und geschlossenen Reaktionszentren können mit Hilfe der Gleichungen A.1 und A.2 berechnet werden:

$$\begin{aligned} J_a = N(1 - Q)(k_d + k_1 + p) C_0 + N Q(k_d + p) C_c \\ - N(1 - Q)[p Q C_c + p(1 - Q) C_0] - N Q[p Q C_c + p(1 - Q) C_0] \end{aligned} \quad (\text{A.7})$$

Die Terme, in denen die Ratenkonstante  $p$  vorkommt, heben sich gegenseitig weg.

$$J_a = N(1 - Q)(k_d + k_1) C_0 + N Q k_d C_c \quad (\text{A.8})$$

Mit

$$J_d = N(1 - Q) k_d C_0 + N Q k_d C_c \quad (\text{A.9})$$

und

$$J_p = N(1 - Q) k_1 C_0 \quad (\text{A.10})$$

ergibt sich Gleichung A.8 zu:

$$J_a = J_d + J_p \quad (\text{A.11})$$

Folglich stellt der Gesamtfluß  $J_a$  und (mit konstantem Absorptionskoeffizienten  $a$ ) auch das durch die Regel-LED bereitgestellte Licht die Summe aus photochemischem Fluß  $J_p$  und thermischem Fluß  $J_d$  dar.

Die Gleichungen A.9 und A.10 verdeutlichen einen der Vorteile der FC-Methode. Die Aussage, daß der Gesamtfluß  $J_a$  die Summe aus photochemischem Fluß  $J_p$  und thermischem Fluß  $J_d$  darstellt, ist unabhängig vom Modell des Energieaustauschs zwischen den Reaktionszentren und ebenfalls unabhängig vom aktuellen Zustand des Quenchers  $Q_A$ .

Unter der Bedingung der konstanten Fluoreszenz werden die Veränderungen in  $C_0$  und  $C_c$  kompensiert durch die Verteilung von offenen und geschlossenen Reaktionszentren. Eine Folge davon ist, daß der Fluß in nichtphotochemische Mechanismen unter FC-Bedingungen konstant gehalten wird, auch wenn sich der Redoxzustand  $Q$  ändert, solange  $k_d$  konstant bleibt.

## A.2. Zusammenhang zwischen $J_a$ , den Ratenkonstanten und dem Redox-Zustand von PS II

Die Fluoreszenz ist direkt proportional zu den Exzitonleveln  $C_0$  und  $C_c$ :

$$F = N k_f [(1 - Q) C_0 + Q C_c] = \frac{k_f}{k_d} J_d \quad (\text{A.12})$$

Der Term auf der rechten Seite ergibt sich aus Gleichung A.9. Mit Hilfe von Gleichung A.5 kann  $C_c$  im mittleren Term in Gleichung A.12 eliminiert werden. Wird das daraus erhaltene  $C_0$  in Gleichung A.10 eingesetzt, ergibt sich:

$$J_p = [(1 - Q) k_1 \frac{k_d + p}{k_d + p + k_1 Q}] \frac{F}{k_f} \quad (\text{A.13})$$

Werden  $J_p$  und  $J_d$  in Gleichung A.11 durch den rechtseitigen Term in Gleichung A.12 und durch Gleichung A.13 ersetzt, folgt:

$$J_a = [k_d + (1 - Q) k_1 \frac{k_d + p}{k_d + p + k_1 Q}] \frac{F}{k_f} = \quad (\text{A.14})$$

$$= \frac{k_d(k_d + k_1 + p) + k_1 p(1 - Q)}{k_d + p + k_1 Q} \frac{F}{k_f} \quad (\text{A.15})$$

$$J_a = N k_{eff} \frac{F}{N k_f} = N E k_{eff} \quad (\text{A.16})$$

mit

$$k_{eff} = \frac{k_d(k_d + k_1 + p) + k_1 p(1 - Q)}{k_d + p + k_1 Q} \quad (\text{A.17})$$

$k_{eff}$  ist die effektive Ratenkonstante oder - in Anlehnung an elektronische Netzwerke - die Exziton-Leitfähigkeit. In dieser Terminologie stellen  $1/k_{eff}$  den Fluß-Widerstand und  $E$ , der durchschnittliche Exzitonlevel, ein Potential dar.

Für das Matrix-Model ( $p \rightarrow \infty$ ) ergibt sich Gleichung A.15 zu:

$$J_a = [k_d + k_1(1 - Q)] \frac{F}{k_f} \quad (\text{A.18})$$

Im Separate-Unit-Model ( $p = 0$ ), erscheint  $Q$  im Nenner:

$$J_a = \frac{k_d(k_d + k_1)}{k_d + k_1 Q} \frac{F}{k_f} \quad (\text{A.19})$$

### A.3. Formale Identität von $J_a$ und $1/F$

Alle charakteristischen Parameter, die den physiologischen Zustand von PS II beschreiben, sind Funktionen der effektiven Ratenkonstante  $k_{eff}$ . Dies führt auf eine Funktion  $G(k_{eff})$ . Unter FC-Bedingungen ist  $F$  konstant und  $J_a$  variabel. Nach Gleichung A.16 kann  $k_{eff}$  durch  $J_a k_f / F$  ersetzt werden, wobei  $k_f / F$  konstant ist.

Unter LC-Bedingungen kann  $k_{eff}$  ebenfalls durch  $J_a k_f / F$  ersetzt werden, wobei allerdings hier der Ausdruck  $J_a k_f$  konstant ist. Diese Überlegung führt auf folgenden Ausdruck:

$$\begin{aligned}
G(k_{eff}) &= \frac{\sum_{i=1}^m c_i \prod_{j=1}^M k_{i,j}}{\sum_{i=1}^n d_i \prod_{j=1}^N k_{i,j}} = \left(\frac{k_f}{F}\right)^{M-N} \frac{\sum_{i=1}^m c_i \prod_{j=1}^M J_{i,j}}{\sum_{i=1}^n d_i \prod_{j=1}^N J_{i,j}} = \quad (A.20) \\
&= \left(\frac{k_f}{F}\right) G(J) = (J_a k_f)^{M-N} \frac{\sum_{i=1}^m c_i \prod_{j=1}^M \frac{1}{F_{i,j}}}{\sum_{i=1}^n d_i \prod_{j=1}^N \frac{1}{F_{i,j}}} = \\
&= (J_a k_f)^{M-N} G\left(\frac{1}{F}\right)
\end{aligned}$$

wobei  $k_{i,j}$  die effektive Ratenkonstante  $k_{eff}$  unter den verschiedenen Aktinlicht-Bedingungen darstellt (z.B.  $k_d$ ,  $k_p$  oder  $k_f$ ).  $J_{i,j}$  sind die jeweiligen Flüsse  $J_a$  gemessen unter FC-Bedingungen bei konstantem  $F$ ,  $F_{i,j}$  ist der jeweilige Fluoreszenz-Yield unter LC-Bedingungen bei konstantem Meßlicht.

Gleichung A.20 impliziert, daß  $J$  durch  $1/F$  ersetzt werden kann, wenn Gleichungen von FC- in LC-Bedingungen umgewandelt werden und umgekehrt.

Wird diese Relation auf Gleichung A.11 angewandt, zeigt sich, daß der photochemische Fluß  $J_p$  mit dem Ausdruck  $1/F_0 - 1/F_M$  korrespondiert. Dieser wurde von Walters und Horton (1993) als ein besseres Maß für Änderungen in den Reaktionszentren favorisiert, da hier kein Einfluß durch thermische Deaktivierung vorliegt.

### A.4. Extremwerte der Flüsse nach Dunkeladaption und unter sättigendem Licht

$F_M$  ( $J_M$ ) und  $F_0$  ( $J_0$ ) Bedingungen ergeben sich aus Gleichung A.14 für  $Q=0$  bzw.  $Q=1$  unabhängig von  $p$ :

$$J_M = \frac{k_d}{k_f} F = J_d \quad (A.21)$$

$$J_0 = \frac{k_d + k_1}{k_f} F = J_d + J_{p,max} \quad (A.22)$$

## A.5. Der Genty-Parameter

Im Rahmen der LC-Methode dient der Genty-Parameter  $\Phi_e$  (Genty et al., 1989) als Maß für photosynthetische Effektivität. Mit  $F'_M = k_f/k_d a I_{mes}$  aus Gleichung A.21 und  $F = (k_f/k_{eff}) a I_{mes}$  (Gleichungen A.15 und A.17) folgt:

$$\Phi_e = \frac{F'_M - F}{F'_M} = \frac{J_p}{J_a} = \frac{J_p}{J_p + J_d} \quad (\text{A.23})$$

bzw.

$$J_p = \frac{F'_M - F}{F'_M} a I_{mes} \quad (\text{A.24})$$

mit  $J_a = a I_{mes}$ .

## A.6. Der Skalierungsfaktor

Im folgenden wird sowohl für die LC- als auch für die FC-Methode die Änderung der Meßgröße ( $dF$  bzw.  $dJ$ ) in Abhängigkeit von der Flußänderung  $dJ_p$  berechnet. Die Ableitung von Gleichung A.23 ergibt:

$$dF = -\frac{F'_M J_d}{(J_p + J_d)^2} dJ_p \quad (\text{A.25})$$

Mit den Definitionen aus den Gleichungen A.21 und A.22 folgt:

$$dF = -\frac{k_f E' k_d E}{(E^2 k_{eff})^2} dJ_p = -\frac{k_f}{k_{eff}} dJ_p = S_{LC} dJ_p \quad (\text{A.26})$$

wobei  $k_{eff}$  durch Gleichung A.17 definiert ist.  $E'$  ist der Exzitonenlevel unter sättigendem Licht,  $E$  der (konstante) Exzitonenlevel unter FC-Bedingungen und  $E'/E = k_{eff}/k_d$ . Folglich nimmt der Skalierungsfaktor  $S_{LC}$  in dem Maße ab, in dem die Flüsse aus der Antenne von PS II zunehmen (gegeben durch  $k_{eff}$ ).

Im Falle der FC-Maschine ergibt sich der Skalierungsfaktor aus der Differentiation von Gleichung A.11:

$$dI_{mes} = \frac{1}{a} dJ_p \quad (\text{A.27})$$

mit  $J_a = a I_{mes}$ .

Hierbei wird der Vorteil der FC-Methode ersichtlich: Der Skalierungsfaktor  $S_{FC} = 1/a$  ist konstant, wenn der Absorptionsquerschnitt  $a$  konstant bleibt.

Der Fluß  $J_p$  ist ein differentieller Fluß, d.h. die Antwort auf das Meßlicht. Der gesamte Fluß  $J_{p,t}$  lautet:

$$J_{p,t} = J_p \frac{I_{act} + I_{mes}}{I_{mes}} \quad (\text{A.28})$$

wobei  $I_{act}$  die Intensität des aktinischen Lichts und  $I_{mes}$  die Intensität des Meßlichts ist.

## A.7. Die traditionellen Quenching-Parameter

Die klassischen Parameter der Analyse von Fluoreszenzdaten mit dem PAM (Schreiber et al., 1986; Van Kooten und Snel, 1990),  $q_p$  und  $q_N$ , lassen sich bei der FC-Methode aus folgenden Gleichungen berechnen:

$$q_p = \frac{J_a - J'_M}{J'_0 - J'_M} \frac{J'_0}{J_a} = \frac{J'_p}{J'_{p,max}} \frac{J'_{p,max} + J'_d}{J'_p + J'_d} \quad (\text{A.29})$$

$$q_N = 1 - \frac{J'_0 - J'_M}{J_0 - J_M} \frac{J_0 J_M}{J'_0 J'_M} \quad (\text{A.30})$$

$$q_N = 1 - \frac{J'_{p,max}}{J_{p,max}} \frac{J_{p,max} + J_d}{J'_{p,max} + J'_d} \frac{J_d}{J'_d} \quad (\text{A.31})$$

Dabei fällt auf, daß das photochemische Quenching  $q_p$  auch den thermischen Fluß  $J_d$  beinhaltet. Es findet bei Verwendung des photochemischen Quenchingparameters zur Darstellung von physiologischen Prozessen also keine saubere Trennung zwischen thermischen und photochemischen Flüssen statt. Dies wurde bereits von Havaux et al. (1991) kritisiert.

Das nichtphotochemische Quenching  $q_N$  beinhaltet den photochemischen Fluß  $J_p$  nur als maximalen photochemischen Fluß  $J_{p,max}$ , so daß hier kein Einfluß durch den aktuellen Wert von  $J_p$  besteht. Dies war anzunehmen, da  $J_p$  bei sättigendem Licht den Wert Null annehmen sollte.

## A.8. Die Berechnung von Q

Die Umformung von Gleichung A.15 führt zu:

$$Q(J_a) = \frac{(k_d + p)(k_d + k_1 - k_f J_a / F)}{k_1(k_f J_a / F + p)} \quad (\text{A.32})$$

Werden  $k_d$  und  $k_1$  mit Hilfe der Gleichungen A.21 und A.22 ersetzt, ergibt sich:

$$Q = \frac{J'_0 - J_a}{J'_0 - J'_M} \frac{J'_M + \frac{p}{k_f} F}{J_a + \frac{p}{k_f} F} \quad (\text{A.33})$$

Für  $p=0$  (Separate-Unit-Modell):

$$Q = \frac{J'_0 - J_a}{J'_0 - J'_M} \frac{J'_M}{J_a} \quad (\text{A.34})$$

Für  $p \rightarrow \infty$  (Matrix-Modell):

$$Q = \frac{J'_0 - J_a}{J'_0 - J'_M} \quad (\text{A.35})$$

Die entsprechenden Gleichungen ergeben sich für die LC-Methode aus Gleichung 39 in Dau (1994). Diese ist identisch mit Gleichung A.32, wenn  $J_a$  durch  $a/F$  ersetzt wird:

$$Q(F) = \frac{(k_d + p) [(k_d + k_1) F - k_f a I]}{k_1 (k_f a I + p F)} \quad (\text{A.36})$$

$$Q(F) = \frac{\frac{1}{F'_0} - \frac{1}{F}}{\frac{1}{F'_0} - \frac{1}{F'_M}} \frac{\frac{1}{F'_M} + \frac{p}{k_f a I}}{\frac{1}{F} + \frac{p}{k_f a I}} \quad (\text{A.37})$$

Für  $p=0$  (Separate-Unit-Modell):

$$Q = \frac{F'_0 - F}{F'_0 - F'_M} \quad (\text{A.38})$$

Für  $p \rightarrow \infty$  (Matrix-Modell):

$$Q = \frac{F'_0 - F}{F'_0 - F'_M} \frac{F'_M}{F} \quad (\text{A.39})$$

# Literaturverzeichnis

- Adams III, W.W.; Demmig-Adams, B.; Winter, K. 1990. Relative contributions of zeaxanthin-related and zeaxanthin-unrelated types of "high energy-state" quenching of chlorophyll fluorescence in spinach leaves exposed to various environmental conditions. *Plant Physiol.* 92: 302-309.
- Affourtit, C.; Krab, K.; Moore, A. L. 2001. Control of plant mitochondrial respiration (Review). *Biochim. Biophys. Acta* 1504: 58-69.
- Alscher, R.G.; Donahue, J.L.; Cramer, C.L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiol. Plant.* 100: 224-233.
- Andersson, B.; Salter, A.H.; Virgin, I.; Vass, I.; Styring, S. 1992. Photodamage to photosystem II-primary and secondary events. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 15: 15-31.
- Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-15.
- Aro, E.-M.; Virgil, I.; Andersson, B. 1993. Photoinhibition of photosystem II, inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113-134.
- Asada, K.; Takahashi, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *Photoinhibition* (Kyle, D. J., Osmond, C.B., Arntzen, C. J., eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 227-287.
- Atkin, O.K.; Evans, J.R.; Siebke, K. 1998. Relationship between the inhibition of leaf respiration by light and enhancement of leaf dark respiration following light treatment. *Australian J. of Plant Physiol.* 25 (4): 437-443.
- Backhausen, J.; Kitzmann, C.; Scheibe, R. 1994. Competition between electron acceptors in photosynthesis: regulation of the malate valve during CO<sub>2</sub> fixation and nitrite reduction. *Photosynth. Res.* 42: 75-86.
- Baker, N.; Webber, A. 1987. Interactions between photosystems. *Advances in Botanical Research* 13: 2-56.

- Barber, J.; Andersson, B. 1991. Light can be both good and bad for photosynthesis. *Trends in Biochem. Science* 17: 61-66.
- Baroli, I.; Melis, A. 1996. Photoinhibition and repair in *dunaliella salina* acclimated to different growth irradiances. *Planta* 198: 640-646.
- Bendixen, R. 1998. Meßtechnische Untersuchungen zur stickstoffabhängigen Lichtresistenz des photosynthetischen Apparates. Dissertation, Kiel.
- Bendixen, R.; Gerendas, J.; Schinner, K.; Sattelmacher, B.; Hansen, U.P. 2001. Difference in zeaxanthin formation in nitrate- and ammonium-grown *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 111: 255-261.
- Bilger, W.; Björkman, O. 1990. Role of xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25: 173-186.
- Bilger, W.; Björkman, O.; Thayer, S. S. 1989. Light induced spectral absorbance changes in relation to photosynthesis and the epoxidation state of xanthophyll cycle components in cotton leaves. *Plant Physiol.* 91: 542-551.
- Bilger, W.; Schreiber, U. 1986. Energy-dependent quenching of dark-level fluorescence in intact leaves. *Photosynth. Res.* 10: 303-308.
- Blacquiere, T.; 1987. Ammonium and nitrate nutrition in *Plantago lanceolata* and *P. major* ssp. *major*. II. Efficiency of root respiration and growth. Comparison of measured and theoretical values of growth respiration. *Plant Physiol. Biochem.* 25: 775-785.
- Braidot, E.; Petrucci, E.; Vianello, A.; Macri, F. 1999. Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS letters* 451: 347-350.
- Britto, D.T.; Siddiqi, M.Y.; Glass, A.D.M.; Kronzucker, H.J. 2001. Futile transmembrane  $\text{NH}_4^+$  cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. *PNAS* 98 (7): 4255-4258.
- Brooks, A.; Farquhar, G.D. 1985. Effect of temperature on the  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. *Planta* 165: 397-406.
- Bruce, D.; Samson, G.; Carpenter, C. 1997. The origins of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in photosynthesis. Direct quenching by  $\text{P680}^+$  in photosystem II enriched membranes at low pH. *Biochemistry* 36: 749-755.

- 
- Brüning, B. 1990. Systemtheoretischer Vergleich der Fluoreszenzantworten des Photosyntheseapparates von Spinatblättern bei Anregung durch Licht und Kohlendioxid. Diplomarbeit, Kiel.
- Casolo, V.; Braidot, E.; Chiandussi, E.; Macri, F.; Vianello, A. 2000. The role of mild uncoupling and non-coupled respiration in the regulation of hydrogen peroxide generation by plant mitochondria. *FEBS letters* 474: 53-57.
- Champigny, M. L.; Brauer, M.; Bismuth, E.; Cao Thi Manh; Siegl, G. 1992. The short-term effect of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_3$  assimilation on sucrose synthesis in leaves. *J. of Plant Physiol.* 139 (3): 361-368.
- Cornic, G.; Briantais, J.-M. 1991. Partitioning of photosynthetic electron flow between  $\text{CO}_2$  and  $\text{O}_2$  reduction in a  $\text{C}_3$  leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different  $\text{CO}_2$  concentrations and during drought stress. *Planta* 183: 178-184.
- Coulomb, C.; Polian, C.; Lizzi, Y.; Coulomb, P.J. 1996. Modifications ultrastructurales de l'appareil photosynthétique au cours de l'infection par le *Phytophthora capsici* de feuilles de pigment sensibles et induites. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Series III, Sciences de la Vie*, 319: 893-899.
- Cramer, M. D.; Lewis, O. A. M. 1993. The influence of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  nutrition on the gas exchange characteristics of the root of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) plants. *Ann. of Bot.* 72: 37-46.
- Critchley, C.; Russell, A.W. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in vivo: the role of protein turnover in photosystem II. *Physiol. Plant.* 92: 188-196.
- Cruz, C.; Lips, S.H.; Martins-Loucao, M.A. 1993. Growth and nutrition of carob plants as affected by nitrogen sources. *J. Plant Nutr.* 16: 1-15.
- Dau, H. 1994. Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochem. Photobiol.* 60: 1-23.
- Dau, H.; Hansen, U.-P. 1988. The involvement of spillover changes in state 1-state 2 transitions in intact leaves at low light intensities. *Biochim. Biophys. Acta* 934: 156-159.
- Dau, H.; Hansen, U.-P. 1990. A study of the energy dependent quenching of chlorophyll fluorescence by means of photoacoustic measurements. *Photosynth. Res.* 25: 269-278.
- Day, D.A.; Krab, K.; Lambers, H.; Moore, A.L.; Siedow, J.N.; Wagner, A.M.; Wiskich, J.T. 1996. The cyanide-resistant oxidase: to inhibit or not to inhibit, that is the question. *Plant Physiol.* 110 (1), 1-2.

- De la Torre, A.; Delgado, B.; Lara, C. 1991. Nitrate-dependent O<sub>2</sub> evolution in intact leaves. *Plant Physiol.* 96: 898-901.
- Del Rio, L.A.; Pastori, G.M.; Palma, J.M.; Sandalio, L.M.; Sevilla, F.; Corpas, F.J.; Jimenez, A.; Lopez-Huertas, E.; Hernandez, J.A. 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol.* 116: 1195-1200.
- Demmig-Adams, B. 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020: 1-24.
- Dörner, W. 1999. Zur Struktur und Funktion des Mangankomplexes im Photosystem II: Spektroskopische Untersuchungen an intakten und teilweise Mangan-verarmten Core-Präparationen. Dissertation, Marburg.
- Dry, I.B.; Dimitriadis, E.; Ward, A.D.; Wiskich, J.T. 1987. The photorespiratory hydrogen shuttle. *Biochem. J.* 245: 667-675.
- Edwards, G. E.; Baker, N. R. 1993. Can CO<sub>2</sub> assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis? *Photosynth. Res.* 37: 89-102.
- Evans, J.R. 1986. The relationship between carbon-dioxide-limited photosynthetic rate and ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase content in two nuclear-cytoplasm substitution lines of wheat, and the coordination of ribulose-bisphosphate-carboxylation and electron-transport capacities. *Planta* 167: 351-358.
- Evans, J.R. 1999. Leaf anatomy enables more equal access to light and CO<sub>2</sub> between chloroplasts. *New Phytol.* 143:93-104.
- Faria, T.; Vaz, M.; Schwanz, P.; Polle, A.; Pereira, J.S.; Chaves, M.M. 1999. Responses of photosynthetic and defence systems to high temperature stress in *Quercus suber* L. seedlings grown under elevated CO<sub>2</sub>. *Plant Biol.* 1: 365-371.
- Fryer, M. J.; Andrews, J. R.; Oxborough, K.; Blowers, D.A.; Baker, N. R. 1998. Relationship between CO<sub>2</sub> assimilation, photosynthetic electron transport, and active O<sub>2</sub> metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiol.* 116: 571-580.
- Furbank, R.; Horton, P. 1987. Regulation of photosynthesis in isolated barley protoplasts: the contribution of cyclic photophosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 894: 332-338.
- Gardeström, P.; Lernmark, U. 1995. The contribution of mitochondria to energetic metabolism in photosynthetic cells. *J. of Bioenerget. and Biomembr.* 27(4): 415-421.
- Gemel, J.; Randall, D.D. 1992. Light regulation of leaf mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. Role of photorespiratory carbon metabolism. *Plant Physiol.* 100: 908-914.

- 
- Genty, B.; Briantais, J.-M.; Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92.
- Giannikos, I. 1995. Aufbau eines Regelkreises für die Chlorophyll-Fluoreszenz zur Exzitonflußmessung. Diplomarbeit, Kiel.
- Giersch, C.; Krause, G.H. 1991. A simple model relating photoinhibitory fluorescence quenching in chloroplasts to a population of altered photosystem II reaction centers. *Photosynth. Res.* 30: 115-121.
- Givan, C.V. 1979. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochem.* 18: 375-382.
- Guo, S. 2001. The effects of N form (ammonium versus nitrate) on growth, photosynthesis and water uptake of *Phaseolus vulgaris* L. plants. Dissertation, Kiel.
- Hanning, I.; Heldt, H.W. 1993. On the function of mitochondrial metabolism during photosynthesis in spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.). Partitioning between respiration and export of redoxequivalents and precursors for nitrate assimilation products. *Plant Physiol.* 103: 1147-1154.
- Hansen, U.-P.; Moldaenke, C.; Tabrizi, H.; Ramm, D. 1993. The effect of transthylakoid proton uptake on cytosolic pH and the imbalance of ATP and NADPH/H<sup>+</sup> production as measured by CO<sub>2</sub>- and light-induced depolarisation of the plasmalemma. *Plant Cell Physiol.* 34: 681-695.
- Häusler, R.E.; Kleines, M.; Uhrig, H.; Hirsch, H.-J.; Smets, H. 1999. Overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Corynebacterium glutamicum* lowers the CO<sub>2</sub> compensation point ( $\Gamma^*$ ) and enhances dark and light respiration in transgenic potato. *J. of Exp. Bot.* 50 (336): 1231-1242.
- Häusler, R.E.; Schlieben, N.H.; Flügge, U.-I. 2000. Control of carbon partitioning and photosynthesis by the triose phosphate/phosphate translocator in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum*). II. Assessment of control coefficients of the triose phosphate/phosphate translocator. *Planta* 210: 383-390.
- Havaux, M.; Strasser, R.J.; Greppin, H. 1991. A theoretical and experimental analysis of the  $q_p$  and  $q_N$  coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and nonphotochemical events. *Photosynth. Res.* 27: 41-55.
- Heber, U.; Egeus, H.; Hanck, U.; Jensen, M.; Koester, S. 1982. Regulation of photosynthetic electron transport and photophosphorylation in intact chloroplasts and leaves of *Spinacia oleracea*. *Planta* 143: 41-49.

- Heber, U.; Gerst, U.; Krieger, A.; Neimanis, S.; Kobayashi, Y. 1995. Coupled cyclic electron transport in intact chloroplasts and leaves of C3 plants: does it exist? if so, what is its function? *Photosynth. Res.* 46: 269-275.
- Heldt, H.W. 1999. Pflanzenbiochemie 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Hoefnagel, M. H. N.; Atkin, O. K.; Wiskich, J. T. 1998. Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Biochim. Biophys. Acta* 1366: 235-255.
- Hoefnagel, M. H. N.; Millar, A. H.; Wiskich, J. T.; Day, D. A. 1995. Cytochrome and Alternative Respiratory Pathways Compete for Electrons in the Presence of Pyruvate in Soybean Mitochondria. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 318(2): 394-400.
- Hormann, H.; Neubauer, C.; Asada, K.; Schreiber, U. 1993. Intact chloroplasts display pH 5 optimum of O<sub>2</sub>-reduction in the absence of methyl viologen: indirect evidence for a regulatory role of superoxide protonation. *Photosynth. Res.* 37: 69-80.
- Horton, P. 1996. Nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. In: Jennings et al. (eds.). *Light as a Source and Information Carrier in Plant Physiology* Plenum Press, New York, pp 99-111.
- Horton, P.; Ruban, A.V. 1993.  $\Delta$  pH-dependent quenching of the F<sub>0</sub> level of chlorophyll fluorescence in spinach leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 1142: 203-206.
- Igamberdiev, A.U.; Bykova, N.V.; Gardestroem, P. 1997. Involvement of cyanide-resistant and rotenone-insensitive pathways of mitochondrial electron transport during oxidation of glycine in higher plants. *FEBS letters* 412: 265-269.
- Igamberdiev, A.U.; Hurry, V.; Krömer, S.; Gardeström, P. 1998. The role of mitochondrial electron transport during photosynthetic induction. A study with barley (*Hordeum vulgare*) protoplasts incubated with rotenone and oligomycin. *Physiol. Plant.* 104: 431-439.
- Igamberdiev, A.U.; Zhou-GuoQuing; Malmberg, G.; Gardestrom, P.; Zhou-G.Q. 1997. Respiration of barley protoplasts before and after illumination. *Physiol. Plant.* 99: 1, 15-22.
- Jakob, B.; Gamalei, Y.; Wolf, R.; Heber, U.; Gross, J. 1997. Photooxidative damage in young leaves declining grapevine: does it result from a new and possible viroid-related disease? *Plant Cell Physiol.* 38: 1-9.
- Jimenez, A.; Hernandez, J.A.; Pastori, G.; del Rio, L.A.; Sevilla, F. 1998. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol.* 118: 1327-1335.

- 
- Karukstis, K. K. 1992. Chlorophyll fluorescence analyses of photosystem II reaction center heterogeneity. *J. Photochem. Photobiol.*
- Katona, E.; Neimanis, S.; Schönknecht, G.; Heber, U. 1992. Photosystem I-dependent cyclic electron transport is important in controlling photosystem II activity in leaves under conditions of water stress. *Photosynth. Res.* 34: 449-464.
- Koolman, J.; Röhm, K.-H. 1998. Taschenatlas der Biochemie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.*
- Krall, J.P.; Edwards, G.E. 1990. Quantum yields of photosystem II electron transport and carbon dioxide fixation in C4 plants. *Australian Journal of Plant Physiology* 17 (5): 579-588.
- Krause, G.H. 1994. The role of oxygen in photoinhibition of photosynthesis. In *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. C. H. Foyer, P. M. Mullineaux, eds., CRC Press, Boca Raton. pp 43-76.
- Kreyszig, E. 1988. Statistische Methoden und ihre Anwendungen. *Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen.*
- Krömer, S. 1995. Respiration during photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 45-70.
- Krömer, S.; Hanning, I.; Heldt, H.W. 1992. On the source of redox equivalents for mitochondrial oxidative phosphorylation in the light. *Molecular, Biochemical and Physiological Aspects of Plant Respiration* 157-175.
- Krömer, S.; Heldt, H.W. 1991. Respiration of pea leaf mitochondria and redox transfer between the mitochondrial and extramitochondrial compartment. *Biochim. Biophys. Acta* 1057: 42-50.
- Krömer, S.; Malmberg, G.; Gardeström, P. 1993. Mitochondrial contribution to photosynthetic metabolism. A study with barley leaf protoplasts at different light intensities and CO<sub>2</sub> concentrations. *Plant Physiol.* 102: 947-955.
- Lambers, H. 1980. The physiological significance of cyanide-resistant respiration in higher plants. *Plant Cell Environ.* 3: 293-302.
- Lambers, H.; Atkin, O. K.; Scheurwater, I. 1996. Respiratory patterns in roots in relation to their functioning. In *Plant roots the hidden half*. Waisel, Y.; Eshel, A.; Kafkafi, U. ed., Marcel Dekker, New York: 323-362.
- Lavergne, J.; Leci, E. 1993. Properties of inactive photosystem II centers. *Photosynth. Res.* 35: 323-343.

- Lawlor, D.W. 1990. Photosynthese. *Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York*.
- Levall, M.W.; Bornman, J.F. 2000. Differential response of a sensitive and tolerant sugarbeet line to *Cercospora beticola* infection and UV-B radiation. *Physiol. Plant.* 109: 21-27.
- Loreto, F.; Di Marco, G.; Tricoli, D.; Sharkey, T.D. 1994. Measurements of mesophyll conductance, photosynthetic electron transport and alternative electron sinks of field grown wheat leaves. *Photosynth. Res.* 41: 397-403.
- Magalhaes, J.S.; Wilcox, G.E. 1983. Tomato growth and mineral composition as influenced by nitrogen form and light intensity. *J. Plant Nutr.* 6: 847-862.
- Manzano, C.; Candau, P.; Gomez-Moren, C.; Relimpio, A.M.; Losada, M. 1976. Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrat and nitrit by particles of *Anacystis nidulans*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 10: 161-169.
- Mano, J.; Miyake, C.; Schreiber, U.; Asada, K. 1995. Photoactivation of the electron flow from NADPH to plastochinone in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 36 (8): 1589-1598.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. *London: Academic Press*.
- Mata, C.; Scheurwater, I., Martins-Loucao, M. A.; Lambers, H. 1996. Root respiration, growth and nitrogen uptake of *Quercus suber* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 34 (5): 727-734.
- Maxwell, D. P.; Wang-Yong; McIntosh, L.; Wang, Y. 1999. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *PNAS* 96 (14): 8271-8276.
- Millar, A. H.; Atkin, O. K.; Menz, R. I.; Henry, B.; Farquhar, G.; Day, D. A. 1998. Analysis of respiratory chain regulation in roots of soybean seedlings. *Plant Physiol.* 117 (3): 1083-1093.
- Millar, H.A.; Wiskich, J.T.; Whelan, J.; Day, D.A. 1993. Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* 329: 259-262.
- Mitchell, P. 1977. Vectorial chemiosmotic processes. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 996-1005.
- Moller, I.M.; Lin, W. 1986. Membrane-bound NAD(P)H dehydrogenases in higher plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 309-334.
- Moore, A.L.; Siedow, J.N. 1991. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1059: 121-140.
- Musrati, R.A.; Kollarova, M.; Mernik, N.; Mikulasova, D. 1998. Malate Dehydrogenase: Distribution, function and properties. *Gen. Physiol. Biophys.* 17: 193-210.

- 
- Nelson, D.; Cox, M. 2001. *Lehninger, Biochemie*, 3. Auflage. Springer Verlag, Berlin.
- Neubauer, C. 1993. Multiple effects of dithiothreitol on nonphotochemical fluorescence quenching in intact chloroplasts. Influence on violaxanthin de-epoxidase and ascorbate peroxidase activity. *Plant Physiol.* 103: 575-583.
- Nicholls, D.G.; Ferguson, S.J. 1992. *Bioenergetics 2*. London: Academic Press.
- Noctor, G.; Foyer, C.H. 1998. A re-evaluation of the ATP:NADPH budget during C<sub>3</sub> photosynthesis: a contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? *J. Exp. Bot.* 49 (329): 1895-1908.
- Oberhuber, W.; Dai, Z.-Y.; Edwards, G. E. 1993. Light dependence of quantum yields of photosystem II and CO<sub>2</sub> fixation in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Photosynth. Res.* 35 (3): 265-274.
- Ögren, E.; Evans, J.R. 1993. Photosynthetic light-response curves. I. The response of CO<sub>2</sub> partial pressure and leaf inversion. *Planta* 189: 182-190.
- Ort, D.R.; Whitmarsh, J. 1990. Inactive photosystem II centers: a resolution of discrepancies in photosystem II quantitation? *Photosynth. Res.* 23: 101-104.
- Padmasree, K.; Raghavendra, A.S. 1999. Response of photosynthetic carbon assimilation in mesophyll protoplasts to restriction on mitochondrial oxidative metabolism: metabolites related to the redox status and sucrose biosynthesis. *Photosynth. Res.* 62: 231-239.
- Park, Y.-I.; Chow, W.S.; Anderson, J.M. 1995. Light inactivation of functional photosystem II in leaves of peas grown in moderate light depends on photon exposure. *Planta* 196: 401-411.
- Pfündel, E.; Bilger, W. 1994. Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynth. Res.* 42: 89-109.
- Pfündel, E.; Nagel, E.; Meister, A. 1996. Analyzing the light energy distribution in the photosynthetic apparatus of C<sub>4</sub> plants using highly purified mesophyll and bundle-sheath thylakoids. *Plant Physiol.* 112: 1055-1070.
- Popov, V. N.; Simonian, R. A.; Skulachev, V. P.; Starkov, A. A. 1997. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in plant mitochondria. *FEBS letters* 415 (1): 87-90.
- Press, W.H.; Fanneny, B.P.; Teukolsky, S.A.; Vetterling, W.T. 1986. *Numerical recipes in Pascal "The art of scientific computing"*, Cambridge University Press.
- Purvis, A.C. 1997. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol. Plant.* 100: 165-170.

- Raab, T.K.; Terry, N. 1994. Nitrogen-source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* 105: 1159-1166.
- Raggi, V. 1995. CO<sub>2</sub> assimilation, respiration and chlorophyll fluorescence in peach leaves infected by *Taphrina deformans*. *Physiol. Plant.* 93: 540-544.
- Raghavendra, A.S.; Padmasree, K; Saradadevi, K. 1994. Interdependence of photosynthesis and respiration in plant cells: Interactions between chloroplasts and mitochondria. *Plant Science* 97: 1-14.
- Reddy, M.M.; Vani, T.; Raghavendra, A.S. 1991. Light-enhanced dark respiration in mesophyll protoplasts from leaves of pea. *Plant Physiol.* 96: 1368-1371.
- Reumann, S.; Heupel, R.; Heldt, H.W. 1994. Compartmentation studies on spinach leaf peroxisomes . II. Evidence for the transfer of reductant from the cytosol to peroxisomal compartment via malate-oxalacetate shuttle. *Planta* 193: 167-173.
- Ribas-Carbo, M.; Berry, J.A.; Yakir, D.; Giles, L.; Robinson, S.A.; Lennon, A.M.; Siedow, J.N. 1995. Electron partitioning between the cytochrome and alternative pathways in plant mitochondria. *Plant Physiol.* 109 (3): 829-837.
- Robard, A.W.; Lucas, W.J. 1990. Plasmodesmata. *Ann. Rev. of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 43: 375-414.
- Rumberg, B.; Schubert, K.; Strelow, F.; Tran-Anh, T. 1990. The H<sup>+</sup> / ATP coupling ratio at the H<sup>+</sup>-ATP-synthase of spinach chloroplasts is four. In: *Current research in photosynthesis* Vol. III. Baltscheffsky ed. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London pp. 125-128.
- Salsac, L.; Chaillou, S.; Morot-Gaudry, J. F.; Lesaint, C.; Jolivet, E. 1987. Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25: 805-812.
- Schinner, K. 1997. Weiterentwicklung und Einsatz der Fluoreszenz-Clamp-Methode für Elektronenflußvergleiche in der Photosynthese. Diplomarbeit, Kiel.
- Schinner, K.; Giannikos, I.; Hansen, U.P. 2000. Fluorescence clamp: a direct measure of fluxes into and out of the antenna pool of PS II. *Photosynth. Res.* 66: 109-123.
- Schinner, K.; Sattelmacher, B.; Hansen, U. P. 2001. Inhibitor-dependent stimulation of photosynthetic electron transport by far-red light in NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-grown plants of *Phaseolus vulgaris* L. In: *Developments in Plant and Soil Sciences: Plant Nutrition*. Vol. 92. Horst et al. eds. Kluwer Academics Publishers Dordrecht, Boston, London, pp 102-103.

- 
- Schinner, K.; Tabrizi, H.; Hansen, U.P. 1998. Indication for the Mehler reaction obtained from comparing photoacoustic and fluorescence-clamp measurements. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* Vol.III. G. Garab ed. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London pp. 1759-1762.
- Schreiber, U. 1986. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequent modulated chlorophyll fluorometer. *Photosynth. Res.* 9: 261-272.
- Schreiber, U.; Bilger, W. 1993. III. Progress in chlorophyll fluorescence research: Major developments during the past years in retrospect. *Prog. Bot.* 54: 151-173.
- Schreiber, U.; Neubauer, C. 1990. O<sub>2</sub>-dependent electron flow, membran energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth. Res.* 25: 279-293.
- Schreiber, U.; Schliwa, U.; Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10: 51-62.
- Shen, Y.-K.; Chow, W.S.; Park, Y.-I.; Anderson, J.M. 1996. Photoinactivation of photosystem II by cumulative exposure to short light pulses during the induction period of photosynthesis. *Photosynth. Res.* 47: 51-59.
- Siedow, J.N. 1982. The nature of the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria. *Recent Adv. Phytochem.* 16: 47-83.
- Siedow, J.N.; Umbach, A.L. 1995. Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *The Plant Cell* 7: 821-831.
- Spors, J. 1997. Vergleichende Messungen der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung mit der Clark-Elektrode. Examensarbeit, Kiel.
- Spors, J. 2001. Vergleich von Meßmethoden für photosynthetische Gasflüsse und Entwicklung eines neuen ortsauflösenden Verfahrens mit dem Massenspektrometer. Diplomarbeit, Kiel.
- Stokes, D.M.; Walker, D.A. 1972. Photosynthesis by isolated chloroplasts. Inhibition by D, L-glyceraldehyde of carbon dioxide assimilation. *Biochem. J.* 128: 1147-1157.
- Tabrizi, H. 1997. Komponentenzerlegung photoakustischer Pulsantworten aus dem Photosyntheseapparat sowie ihr Einsatz bei der Untersuchung des transthylakoiden Protonenflusses und beim Nachweis der Mehler-Reaktion. Dissertation, Kiel.
- Turpin, D.H.; Bruce, D. 1990. Regulation of photosynthetic light harvesting by nitrogen assimilation in green alga *Selenastrum minutum*. *FEBS Letters* 263: 99-103.
-

- Umbach, A.L.; Wiskich, J.T.; Siedow, J.N. 1994. Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. *FEBS Lett.* 348: 181-184.
- Vanselow, K.H. 1993. The effect of N-nutrients on the acceptor pool of PS I and thylakoid energization as measured by chlorophyll fluorescence of *Dunaliella salina*. *Journal of Exp. Botany* 44: 1331-1340.
- Vanlerberghe, G. C.; Day, D. A.; Wiskich, J. T.; Vanlerberghe, A. E.; McIntosh, L. 1995. Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria: dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation. *Plant Physiol.* 109 (2): 353-361.
- van Kooten, O.; Snel, J.F.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25: 147-150.
- van Quy, L.; Foyer, C.; Champigny, M.-L. 1991. Effect of light and  $\text{NO}_3^-$  on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *Plant Physiol.* 97: 1476-1482.
- Verhoeven, A.S.; Demmig-Adams, B.; Adams III, W.W. 1997. Enhanced employment of the xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N stress. *Plant Physiol.* 113: 817-824.
- von Caemmerer, S.; Farquhar, G.D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* 153: 376-387.
- Wagner, A. M.; Krab, K. 1995. The alternative respiration pathway in plants: role and regulation. *Physiologia Plantarum* 95: 318-325.
- Walch-Liu, P.; Neumann, G.; Bangerth, F.; Engels, C. 2000. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *J. of Exp. Botany* 51 (343): 227-237.
- Walters, R.G.; Horton, P. 1993. Theoretical assessment of alternative mechanisms for non-photochemical quenching of PS II fluorescence in barley leaves. *Photosynth. Res.* 36: 119-139.
- Weis, E.; Berry, J.A. 1987. Quantum efficiency of Photosystem 2 in relation to "energy" dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 894: 189-208.
- Witt, H.T. 1979. Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods. *Biochim. Biophys. Acta* 505: 355-427.
- Wong, S.-C.; Woo, K.C. 1986. Simultaneous measurements of steady state chlorophyll a fluorescence and  $\text{CO}_2$  assimilation in leaves. The relationship between fluorescence and photosynthesis in  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  plants. *Plant Physiol.* 80: 877-883.

- 
- Wu, J.; Neimanis, S.; Heber, U. 1991. Photorespiration is more effective than the Mehler reaction in protecting the photosynthetic apparatus against photoinhibition. *Bot. Acta* 104: 283-291.
- Wulff, C. 2000. Eignung der photoakustischen Meßtechnik im 500-ms-Bereich zur Untersuchung der Gasflüsse der Dunkelreaktionen in der Photosynthese. Diplomarbeit, Kiel.
- Xue, X.; Gauthier, D.A.; Turpin, D.H.; Weger, H.G. 1996. Interactions between photosynthesis and respiration in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 112 (3): 1005-1014.
- Zhang, H.; Jennings, A.; Barlow, P.W.; Forde, B.G. 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *PNAS* 96: 6529-6534.
- Zhu, Z.; Gerendas, J.; Bendixen, R.; Schinner, K.; Tabrizi, H.; Sattelmacher, B.; Hansen, U.-P. 2000. Different tolerance to light stress in  $\text{NO}_3^-$ - and  $\text{NH}_4^+$ -grown *Phaseolus vulgaris* L. *Plant biol.* 2: 558-570.