

Biophysikalische Untersuchungen zur Wirkung  
des Pilzbefalls im Weizen auf die Prozesse  
der Photosynthese und ihre Eignung für  
die Befallserfassung vom fahrenden Traktor



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

von  
Enno Hammes

16. März 2005

Referent/in: .....

Korreferent/in: .....

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Zum Druck genehmigt: Kiel, .....

.....

Der Dekan

Für meinen Bruder



## Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit sind bereit wie folgt veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Hammes, E., Hoffmann, A., Plieth, C. und Hansen, U.-P. (2005) Light-induced decrease in DCF-fluorescence of leaves of wheat in the presence of SHAM. *Protoplasma* (im Druck)

Hammes, E. and Hansen, U.-P. Using the rear slope of the response of Chl fluorescence to saturating flashes for the study of the discharge of PS I acceptors (in Vorbereitung)

Hoffmann, A., Hammes, E., Plieth, C., Desel, C., Sattelmacher, B. and Hansen, U.-P. (2005) Effect of CO<sub>2</sub> supply on ROS formation in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* (im Druck)

## Tagungsposter

Hammes, E., Hoffmann, A., Desel, C., Plieth, C., Schnieder, F., Verreet, J.A. and Hansen, U.-P. *Interference of fungal infection with photosynthesis*. Poster 15-19, Botanikertagung Braunschweig 2004 (als Abb. im Anhang auf Seite 204)

Hoffmann, A., Desel, C., Hammes, E., Plieth, C., Milde, S., Sattelmacher, B. and Hansen, U.-P. *ROS production in leaves of A. thaliana as affected by different nitrogen sources*. Poster 25-04, Botanikertagung Braunschweig 2004 (als Abb. im Anhang auf Seite 205)



# Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen und Begriffe . . . . .	XII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Stand der Forschung</b>	<b>5</b>
2.1 Eigene Vorarbeiten . . . . .	8
2.2 Messungen von Eiko Thiessen . . . . .	9
2.3 Nachweis von pilzlichen Pflanzenkrankheiten des Weizens am Beispiel des Erregerkomplexes <i>Fusarium</i> spp. durch molekulare Techniken . . . . .	10
<b>3 Photosynthese und Pflanzenstoffwechsel</b>	<b>11</b>
3.1 Aufbau einer Pflanzenzelle . . . . .	11
3.2 Chloroplasten . . . . .	12
3.2.1 Photosysteme . . . . .	12
3.2.2 Elektronentransportkette . . . . .	13
3.2.3 Zyklischer Elektronentransport und Mehler-Reaktion . . . . .	14
3.2.4 Calvin-Zyklus . . . . .	15
3.2.5 Stickstoffassimilation . . . . .	15
3.2.6 Xanthophyll-Zyklus . . . . .	16
3.2.7 Export . . . . .	16
3.2.8 Chlororespiration . . . . .	17
3.3 Mitochondrien . . . . .	17
3.3.1 Citrat-Zyklus (TCA-Zyklus) . . . . .	18
3.3.2 Elektronentransportkette und ATP-Erzeugung . . . . .	18
3.3.3 Alternative Oxidase (AOX) . . . . .	20
3.3.4 Erzeugung von Reaktivem Sauerstoff (ROS) in den Mitochondrien . . . . .	20
3.4 Photorespiration . . . . .	20
3.5 Zusammenfassende Darstellung . . . . .	23
<b>4 Pflanzen und Messsysteme</b>	<b>25</b>
4.1 Verwendete Pflanzen . . . . .	25
4.1.1 Giersch ( <i>Aegopodium podagraria</i> ) . . . . .	25
4.1.2 Weizen ( <i>Triticum aestivum</i> ) . . . . .	25
4.2 Weizenpathogene . . . . .	26
4.2.1 Infektionsverlauf . . . . .	27
4.2.2 Erkennung und Bekämpfung . . . . .	28
4.2.3 Infektion der Pflanzen im Labor . . . . .	29
4.3 Stoffwechselgifte . . . . .	29
4.4 Fluoreszenzmessung . . . . .	31
4.4.1 Chlorophyll-Fluoreszenz . . . . .	31
4.4.2 Quenching-Mechanismen . . . . .	32
4.4.3 Fluoreszenzkinetik . . . . .	34
4.4.4 Methoden der Fluoreszenzmessung . . . . .	36

4.5	Fluoreszenz- und Gasflussmessaufbau . . . . .	40
4.5.1	Messaufbau FC-Platz . . . . .	40
4.5.2	Messaufbau Gasfluss-Platz . . . . .	42
4.5.3	Mess- und Steuersoftware . . . . .	44
4.5.4	Auswertungssoftware . . . . .	47
<b>5</b>	<b>Klassische Chlorophyll-Fluoreszenzsignale</b>	<b>49</b>
5.1	Messaufbau und Ablauf . . . . .	49
5.1.1	Einsatz von Stoffwechsellinhibitoren . . . . .	49
5.1.2	Auswertung . . . . .	50
5.2	Ergebnisse bei gesunden und infizierten Blättern . . . . .	50
5.3	Gesunde und infizierte Blätter mit Inhibitoren . . . . .	52
5.4	Zusammenfassung in Gruppen . . . . .	57
<b>6</b>	<b>Analyse der Blitzrückstellflanken nach sättigenden Blitzen</b>	<b>59</b>
6.1	Messaufbau und Ablauf . . . . .	60
6.2	Die langsame Komponente der Blitzrückstellflanke . . . . .	60
6.3	Einfluss von Inhibitoren . . . . .	62
6.4	Numerische Auswertung der Effekte auf die Rückstellflanken . . . . .	63
6.4.1	Prozesse und Zeitkonstanten, die zur Form der Rückstellflanke beitragen . . . . .	63
6.4.2	Fit der Rückstellflanken . . . . .	64
6.5	Diskussion . . . . .	67
6.6	Zusammenfassung . . . . .	68
<b>7</b>	<b>Anwendung der Analyse der Blitzrückstellflanken auf infizierte Pflanzen</b>	<b>69</b>
7.1	Mess- und Infektionsverfahren . . . . .	69
7.2	Rückstellflanken bei gesunden und infizierten Pflanzen ohne Stoffwechselgifte . . . . .	70
7.3	Blitzflanken bei Infektion mit Stoffwechselgiften . . . . .	70
7.4	Blitzrückstellflanken bei Infektion mit Stoffwechselgiften mit Fernrot-Licht . . . . .	74
7.5	Schlussfolgerungen . . . . .	75
<b>8</b>	<b>Antworten auf Fernrot</b>	<b>77</b>
8.1	Messprogramm . . . . .	77
8.2	Auswertung und Optimierung der Lichtparameter . . . . .	78
8.2.1	Ermittlung der Messwerte . . . . .	78
8.2.2	Optimierung der Licht- und Infektionsparameter . . . . .	80
8.3	Ergebnisse . . . . .	81
8.3.1	Verschiedene Phasen der Infektion . . . . .	81
8.4	Erklärung der unterschiedlichen FR-Wirkung bei gesunden und inf. Pflanzen . . . . .	82
<b>9</b>	<b>Hinweise auf zusätzliche PS-I-Akzeptoren neben dem Calvin-Zyklus</b>	<b>83</b>
9.1	Ein Hinweis aus der Neuinterpretation alter Daten . . . . .	83
9.2	Wiederholung der Frequenzgangmessungen . . . . .	84
9.2.1	Messaufbau und Ablauf . . . . .	84
9.2.2	Ergebnisse . . . . .	84
9.3	Hinweis auf die Existenz zusätzlicher Akzeptoren durch Simultanmessung von O <sub>2</sub> und CO <sub>2</sub> . . . . .	86
9.4	Analyse der unterschiedlichen Kurvenverläufe . . . . .	87
9.5	Numerische Analyse der unterschiedlichen Kurvenverläufe . . . . .	88
9.6	Zusammenfassung . . . . .	89
<b>10</b>	<b>Gasflussmodulation an Weizen</b>	<b>91</b>
10.1	Gassprungantworten zur Unterscheidung von infizierten und nicht-inf. Blättern . . . . .	92

10.2	Weitere Ausgangssignale . . . . .	94
10.2.1	Vorversuche zur Chloroplastenbewegung . . . . .	94
10.2.2	Übersicht über die Signale . . . . .	94
10.2.3	Scattering bei 535 nm: Membran-Energetisierung . . . . .	95
10.2.4	Absorption bei 505 nm: Zeaxanthin . . . . .	95
10.2.5	Quantitative Analyse des Scattering-Signals . . . . .	96
10.2.6	Transmission bei 505 nm: Zeaxanthin . . . . .	98
10.3	Schlüsse aus den CO <sub>2</sub> -Gassprungmessungen . . . . .	98
10.4	O <sub>2</sub> -Sprünge bei gesundem und infiziertem Weizen . . . . .	99
10.4.1	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	99
10.4.2	Fazit aus den O <sub>2</sub> -Sprung Messungen . . . . .	101
10.5	Jahreszeitliche Unterschiede . . . . .	102
10.5.1	Photochemischer Fluss . . . . .	102
10.5.2	Scattering . . . . .	102
10.5.3	Darstellung des Jahresganges der Änderungen . . . . .	104
<b>11</b>	<b>Frequenzgänge</b> . . . . .	<b>105</b>
11.1	Messaufbau und Ablauf . . . . .	105
11.2	Ergebnisse . . . . .	106
11.2.1	Aussagen der Tabelle 11.1 . . . . .	107
11.2.2	Aussagen der Tabelle 11.2 . . . . .	108
11.3	Auswertung der Messungen . . . . .	114
<b>12</b>	<b>Messungen an Stomata</b> . . . . .	<b>119</b>
12.1	Spaltöffnungen . . . . .	119
12.2	Messaufbau und Ablauf . . . . .	120
12.2.1	Gaswechsellanlage . . . . .	120
12.2.2	Berechnung der Transpiration und stomatären Leitfähigkeit . . . . .	121
12.2.3	Berechnung der Photosynthese-Rate . . . . .	122
12.2.4	Mikroskop . . . . .	122
12.2.5	Messablauf und Datenauswertung . . . . .	122
12.2.6	Verwendete Pflanzen und Infektion . . . . .	123
12.3	Ergebnisse . . . . .	124
12.3.1	Messung unter 50% Luftfeuchte . . . . .	124
12.3.2	Messung unter hoher Luftfeuchte . . . . .	125
<b>13</b>	<b>Windeinflüsse auf die CO<sub>2</sub>-Versorgung</b> . . . . .	<b>127</b>
13.1	Versuchsaufbau und Messablauf . . . . .	127
13.2	Störung der Schichtung über dem Blatt . . . . .	127
13.3	Bestimmung der Umkehrkonzentration . . . . .	129
13.4	Verschiedene Umkehrkonzentrationen beim photochemischen und thermischen Fluss . . . . .	130
13.5	Abschätzung des Windeinflusses auf dem Feld . . . . .	131
<b>14</b>	<b>Nachweis von reaktivem Sauerstoff (ROS) mit Hilfe von Farbstoffen</b> . . . . .	<b>133</b>
14.1	Farbstoffe für den Nachweis von reaktivem Sauerstoff . . . . .	133
14.1.1	Dichlorofluorescein-Diacetate (DCF-DA) . . . . .	133
14.1.2	Nitroblue-Tetrazolium (NBT) und Diaminobenzidine (DAB) . . . . .	134
14.2	Fluoreszenzmikroskop für DCF-Messungen . . . . .	135
14.2.1	Aufbau und Fluoreszenzmessung . . . . .	135
14.2.2	Messsteuerung und Bildauswertung . . . . .	136
14.2.3	Aktinisches Licht . . . . .	137
14.3	Morphologische Untersuchungen zur ROS-Entwicklung bei Pilzbefall . . . . .	138

14.3.1	Bildaufnahme . . . . .	138
14.3.2	Pilzhyphen . . . . .	138
14.3.3	Unterschiede der Farbstoffe . . . . .	139
14.4	ROS-Bilder mit NBT . . . . .	142
14.5	Infektionsverlauf mit DAB-ROS-Bildern . . . . .	143
14.5.1	Bilder des Infektionsverlaufes ohne Inhibitoren . . . . .	144
14.5.2	Bilder des Infektionsverlaufes unter SHAM . . . . .	147
14.5.3	Bilder des Infektionsverlaufes unter Glyceraldehyd . . . . .	148
14.5.4	Detailfragen der ROS-Bilder unter SHAM und Glyceraldehyd . . . . .	148
14.5.5	Detailaufnahmen einiger ROS-Quellen . . . . .	151
14.5.6	Zusammenfassung . . . . .	152
14.6	ROS-Entwicklung nach 5-stündiger Vorbeleuchtung . . . . .	153
14.6.1	Lichtstabilität von DCF . . . . .	153
14.6.2	Beladung der Pflanzen mit Farbstoff und Giften, Messablauf . . . . .	154
14.6.3	Ergebnisse . . . . .	154
14.7	Licht-induzierte ROS-Entwicklung . . . . .	155
14.7.1	Messablauf . . . . .	155
14.7.2	Auswertung . . . . .	155
14.7.3	Ergebnisse der Messungen mit Starklicht . . . . .	155
14.7.4	Induktion der ROS-Bildung mit Schwachlicht . . . . .	158
14.7.5	ROS-Entwicklung in der Dunkelpphase . . . . .	158
14.7.6	Vergleich der verschiedenen Lichtbedingungen . . . . .	160
<b>15</b>	<b>Hinweis auf eine mögliche Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung</b>	<b>163</b>
15.1	Messaufbau und Ablauf . . . . .	163
15.2	Ergebnisse der Messungen an uninfizierten Blättern . . . . .	164
15.2.1	Kontrolle . . . . .	164
15.2.2	SHAM . . . . .	164
15.2.3	Schlussfolgerung . . . . .	167
15.3	Ergebnisse der Messungen an infizierten Blättern . . . . .	167
15.3.1	Messungen mit Anstieg im Dunkeln (Typ Abb. 15.2) . . . . .	167
15.3.2	Messungen ohne Anstieg im Dunkeln (Typ Abb. 15.1) . . . . .	168
15.4	Zusammenfassug . . . . .	168
<b>16</b>	<b>Zeaxanthin und HPLC</b>	<b>171</b>
16.1	Messverfahren und Aufbau . . . . .	171
16.1.1	HPLC-Messung . . . . .	171
16.1.2	Kombinationsmessungen mit Absorption bei 505 nm . . . . .	172
16.2	Probenextraktion . . . . .	172
16.3	Auswertung . . . . .	173
16.3.1	Spektralphotometrische Bestimmung der Chlorophyll-Gehalte . . . . .	173
16.3.2	Bestimmung der Xanthophyll-Gehalte aus den Chromatogrammen . . . . .	174
16.4	Ergebnisse . . . . .	176
16.4.1	Absolute HPLC-Messwerte . . . . .	176
16.4.2	Licht-induzierte Änderungen des Zeaxanthingehaltes . . . . .	177
16.5	Zeaxanthin-Bestimmung mittels 505-Signal bei Weizen . . . . .	178
16.5.1	Messablauf . . . . .	178
16.5.2	Ergebnisse . . . . .	179
16.5.3	Vergleich von HPLC und Transmission bei 505 nm . . . . .	180
16.5.4	Schlussfolgerungen . . . . .	181
<b>17</b>	<b>Algenfluorometer</b>	<b>183</b>
17.1	Messaufbau und Ablauf . . . . .	183

---

17.2	Ergebnisse . . . . .	184
17.2.1	$F_0$ -Dunkelfluoreszenz . . . . .	185
17.2.2	$F_M$ -Fluoreszenz (Blitz) . . . . .	187
17.2.3	F-Fluoreszenz . . . . .	187
17.2.4	Zusammenfassung . . . . .	187
<b>18</b>	<b>Fazit und Ausblick</b>	<b>189</b>
18.1	Infektionserkennung . . . . .	189
18.2	Elektronenfluss-Verzweigung hinter PS I . . . . .	192
18.3	Wirkung der Pilzinfektion auf die Umschaltung der PS-I-Akzeptoren . . . . .	195
18.4	Hinweise zur Pilzabwehr . . . . .	197
18.5	Ausgangspunkt und Ansätze zur Fortführung und Vertiefung . . . . .	198
<b>19</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>199</b>
<b>A</b>	<b>Bezugsquellen</b>	<b>203</b>
A.1	Chemikalien . . . . .	203
A.2	Geräte . . . . .	203
<b>B</b>	<b>Tagungsposter</b>	<b>206</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>207</b>

## Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen und Begriffe

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Chl	Chlorophyll
DAB	Diaminobenzidine
DCF-DA	Dichlorofluorescein-Diacetate
EPS	Epoxylierungsstatus des Xanthophyll-Zyklus
ETC	lineare Elektronentransportkette
$F_0$	Grundfluoreszenz bei offenen Reaktionszentren
$F_M$	Maximalfluoreszenz bei geschlossenen Reaktionszentren
FC-Maschine	Fluoreszenz-Clamp-Maschine
FR	Fernrot: Licht mit $\lambda > 700$ nm, regt hauptsächlich PS I an
HL	High-Light
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LED	Leuchtdiode
LHC	Light Harvesting Complex
LL	Low-Light
NAD(P)H	nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NP	Nettophotosynthese-Rate
P680, P700	Reaktionszentrumsmolekül von PS II bzw. PS I
PAM	Puls-Amplituden-Moduliertes Fluorometer
PBS	Phosphate-buffered saline buffer
PQ	Plastoquinon
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , Reaktiver Sauerstoff
PS I, PS II	Photosystem I bzw. II
$Q_A$ , $Q_B$	Akzeptoren von PS II
$q_E$	Energy-Quenching
$q_N$	nichtphotochemisches Quenching
$q_P$	photochemisches Quenching
RubisCO	Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
SHAM	Salicylhydroxamic acid
SM-Medium	Standard-Medium: 1 mM KCl, 1mM CaCl, 1mM MgCl <sub>2</sub> , pH 6,2

# Kapitel 1

## Einleitung

Pilzbefall auf Getreidefeldern kann in feuchten Regionen wie in Schleswig-Holstein zu erheblichen Ernteeinbußen führen. Die übliche phytosanitäre Vorgehensweise ist die einheitliche, ganzflächige Behandlung von Pflanzenbeständen mit Fungiziden. Dieses Verfahren gilt als sehr umweltbelastend. Denn in der Regel sind nicht alle Pflanzen eines Feldes gleichmäßig infiziert und die eingetragene Giftmenge übersteigt die wirklich notwendige bei weitem. Hieraus erwächst aus finanziellen und ökologischen Gründen die Forderung, die Ausbringung von Fungiziden an den tatsächlichen Bedarf anzupassen.

Ein Schritt in diese Richtung ist die Ausbringung der Gifte in Abhängigkeit von der Wetterlage (Verreet et al., 2000): Bei trockenem, sonnigem Wetter besteht keine Gefahr. Erst wenn es über einen bestimmten Zeitraum feucht gewesen ist, erhalten die Bauern die Aufforderung zum Spritzen. Wenn die Methode auch bereits die Giftmenge stark reduziert hat, so bleibt doch der Wunsch nach weiterer Anpassung an den tatsächlichen, insbesondere teilflächenspezifischen Bedarf.

Das Fernziel ist damit eine Erkennung des Pilzbefalls vom fahrenden Traktor und die dadurch mögliche hochangepasste Ausbringung der Bekämpfungskemikalien. Hierzu müssen leicht messbare Signale von der Pflanze gefunden werden, die den Befall anzeigen. Für den Biophysiker stellen sich damit folgende Fragen:

- Gibt es befallanzeigende Signale von der Pflanze?
- Wie können diese Signale vom fahrenden Traktor aus registriert werden?

Tucker und Chakraborty (1997) haben ein digitales Bildverarbeitungssystem entwickelt, das automatisch Läsionen von Blättern entdecken kann. So faszinierend diese Technik auch ist, so ist sie aus zwei Gründen zur Zeit noch nicht für die Infektionserkennung einsetzbar: Die Leistungsfähigkeit von Laptops ist noch nicht so groß, dass eine Online-Bildauswertung vom fahrenden Traktor aus möglich ist. Zusätzlich ist es auch eher unwahrscheinlich, dass das System den Befall im Frühstadium erkennen kann, wenn noch keine sichtbare Blattschädigung auftritt.

Leichtere Messbarkeit und Auswertbarkeit verspricht ein Signal, das sich in der Pflanzenbonitur (Beurteilung des Gesundheitszustandes) in großem Maße durchgesetzt hat: die Chlorophyll-Fluoreszenz (Schreiber et al., 1986; Schreiber und Bilger, 1993; Strasser et al., 1995). Sehr einfach ist die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes als Maß für die photosynthetisch aktive Biomasse. Die sogenannten Vegetationsindizes, die auf der Bestimmung der Reflexionsverhältnisse  $R_{750}/R_{550}$  und  $R_{750}/R_{700}$  beruhen (Lichtenthaler et al., 1996; Gitelson et al., 1996, 1998), sind so leistungsfähig, dass sie sogar vom Satelliten aus eingesetzt werden können. Fouche (1992) setzte eine Infrarot-Kamera in einem ferngesteuerten Flugzeug ein, um Wassermangel zu überwachen. Für den Einsatz vom fahrenden Traktor zur Online-Steuerung der Stickstoffdüngung wurde in Kiel in der AG Heege ein Verfahren entwickelt, welches über den Wendepunkt im Rot-zu-Infrarot-Anstieg des Reflexionsspektrums den Chlorophyllgehalt und den Blattflächenindex ermittelt. Dieses Verfahren wird von der Industrie kommerziell angeboten (Hydro N-Sensor) und bereits weltweit eingesetzt. Unterschiede in den photosynthetischen Pigmenten sind die

Grundlage, um durch Anregung bei bis zu 7 verschiedenen Wellenlängen und Detektion bei vier verschiedenen Wellenlängen Algenklassen zu unterscheiden (Kolbowski und Schreiber, 1995; Beutler et al., 2002, 2003, 2004).

Alle diese Verfahren messen den Gehalt an Chlorophyll oder anderen Antennenpigmenten. Doch das Ziel bei der rechtzeitigen Erkennung des Pilzbefalls ist es, die Infektion bereits dann zu detektieren, wenn das Blatt noch grün ist und eine phytosanitäre Maßnahme das Fortschreiten noch stoppen könnte. Das heißt, der Befall soll in einem Stadium erkannt werden, in dem der Pilz gerade angefangen hat das Blatt zu infizieren. Da die Photosysteme sehr robust sind (bzw. durch Reparatursysteme sofort nach einem Schaden wieder hergestellt werden, Baroli und Melis, 1996), ist nicht damit zu rechnen, dass ein Pilzbefall im Frühstadium durch eine Chlorophyllgehaltsbestimmung erkannt werden kann.

Änderungen in den Stoffwechselprozessen können dadurch entstehen (und möglicherweise sichtbar werden), dass die Pflanze bestimmte Prozesse stimuliert oder deaktiviert. Dies kann im Rahmen einer Abwehrstrategie (Radikalerzeugung, Verdickung), als Folge der Schädigung oder initiiert durch den Pilz zur Mobilisierung der Reserven der Pflanze (um sie auszubeuten) geschehen. Folgen dieser Prozesse sollten aber den Chlorophyllgehalt unverändert lassen und allenfalls in der variablen Fluoreszenz sichtbar werden.

In der Diplomarbeit (Hammes, 2000) wurde hinsichtlich der obigen beiden Fragen ein Weg beschritten, der von der umgekehrten Reihenfolge ausging: erst die Lösung technischer Probleme, dann die Untersuchung, ob die Signale sich überhaupt eignen. Dies liegt daran, dass ein technisches Problem sich besser für die Bearbeitung in einer physikalischen Diplomarbeit eignet. Allerdings lagen aus den im Kapitel 2 zu besprechenden Vorarbeiten von Eiko Thiessen bereits Hinweise vor, dass die variable Chlorophyll-Fluoreszenz sich bei Pilzbefall verändert.

Die Auswertung der zeitlichen Veränderung der Chlorophyll-Fluoreszenz nach einem Lichtblitz sollte dadurch erreicht werden, dass eine Reihe von Detektoren, längsseits am Traktor angebracht, den gleichen Blattbestand zeitlich versetzt sehen (durch die Fahrt des Traktors). In der Machbarkeitsstudie in der Diplomarbeit Hammes (2000) wurde der Traktor im Labor durch eine Märklin-Spur-I-Eisenbahn ersetzt. Es konnten folgende Probleme gelöst werden: Ein Normierungsverfahren, das das blaue vom Blatt reflektierte Licht zur Skalierung der roten Fluoreszenzantwort nimmt, ermöglichte die Messung vom wippenden Traktor auch, wenn der Blattabstand im Bereich von 1 m stark schwankte. Das Wiederfinden derselben Blätter in den Spuren verschiedener Detektoren konnte mit Hilfe einer Kreuzkorrelation zwischen den Datenspurten erreicht werden.

Die technischen Probleme der Messung im Feld waren also beherrschbar. Die Frage, die offen blieb, war nur: Gibt es überhaupt etwas zu messen? Die Diplomarbeit schloss zwar damit, dass auf den fahrenden Zug gelegte infizierte Blätter bei der Durchfahrt unter der Detektorreihe von gesunden unterschieden werden konnten. Doch ob die kleinen Unterschiede, die unter Laborbedingungen zur Identifikation genügten, wirklich für eine Pilzerkennung im Feld reichen würden, war noch offen.

In dem darauf folgenden DFG-Projekt Ha712/16-1,2 der Arbeitsgruppen Hansen, ZBM, und Verreet, Phytopathologie, in dessen Rahmen die vorliegende Dissertation angefertigt wurde, ging es darum, zu suchen, unter welchen Bedingungen Signale aus dem photosynthetischen Apparat einen maximalen Unterschied zwischen infizierten und gesunden Blättern zeigten. Besonderes Gewicht legte die DFG aber auf die Grundlagenforschung, das heißt, auf die Untersuchung, welche pilz-induzierten Umschaltungen in den Stoffwechselwegen des Blattes die Signale aus dem photosynthetischen Apparat verändern.

Im folgenden Kapitel wird ausgeführt, dass zahlreiche Phänomene (Radikalerzeugung, Ascorbat-Erschöpfung, Glutathion-Erhöpfung, Stimulation der Atmung) beobachtet werden, die in pathogenbefallenen Pflanzen und in solchen, die mit Ammonium statt mit Nitrat als Stickstoffquelle ernährt wurden, ähnlich sind. Die Wirkung der N-Form auf die Stoffwechselwege in Blättern ist Gegenstand des gemeinsamen DFG-Projektes Sa 359/13-1,2 der Arbeitsgruppen Sattelmacher, Pflanzenernährung, und Hansen, ZBM. So ist es naheliegend, dass die Arbeits-

hypothesen für die vorliegende Dissertation sich an die in Zhu et al. (2000) aufgestellte Hypothese über den Einfluss der N-Form bei nitrat- und ammonium-ernährten Pflanzen anlehnt. Im Zentrum des Modells steht dort das Problem, dass die photosynthetische Elektronentransportkette einen Überschuss an Redox-Äquivalenten im Vergleich zur ATP-Erzeugung liefert. Noctor und Foyer (1998) beschreiben verschiedene Strategien der Pflanzen zum Ausgleich dieser Unsymmetrie. Hiermit bietet die Proteinsynthese der nitraternährten Pflanzen zusammen mit der notwendigen Bereitstellung von C-Skeletten einen scheinbar sehr vorteilhaften Stoffwechselweg, während die ammonium-ernährten Pflanzen, die die Proteinsynthese in der Wurzel durchführen, stattdessen auf sehr viel „riskantere“ Wege zurückgreifen müssen; riskant in dem Sinne, dass mehr Radikale erzeugt werden. Insbesondere wird angenommen, dass der Pathogenbefall zu einer Veränderung in der Verzweigung des Redox-Flusses hinter PS I führt und damit zu einer unterschiedlichen Kopplung zwischen Mitochondrien und Chloroplasten. Nach den oben genannten Phänomenen sieht es so aus, als verhielte sich die befallene Pflanze wie eine ammonium-ernährte Pflanze.

Allerdings mag die Ursache eine ganz andere sein. Während im N-Form-Projekt wahrscheinlich das ATP/Redox-Stöchiometrie-Problem zur Wahl der jeweiligen Stoffwechselwege führt, können beim Pathogen-Befall andere Mechanismen die Steuerung übernehmen, wie zum Beispiel die folgenden Signale vom Pilz: IAA, Cytokine (Sziráki et al., 1975), Jasmonat (Creelman und Mullet, 1997), Zucker (Ehness et al., 1997; Koch et al., 2000), Plasmalemma-Rezeptoren (Keen, 1990), G-Proteine (Vera-Estrella et al., 1994), die die Respiration und das Blatt-Wachstum erhöhen. Während die Erzeugung von Radikalen in ammonium-ernährten Pflanzen ein „technisches Versagen“ zu sein scheint, kann sie beim Befall durchaus ein Teil der Abwehrstrategie sein. Die Anlehnung an die Stickstoff-Arbeitshypothese bedeutet nicht, dass die Ergebnisse aus dem N-Form-Projekt direkt übernommen werden. Aber die Fragestellungen sind dort ähnlich und die experimentellen Voraussetzungen vorhanden, sie zu beantworten.

In der vorliegenden Arbeit werden also ähnliche biophysikalische Messungen wie beim Stickstoffprojekt zum Einsatz kommen (z. B. Messung von Chlorophyll-Fluoreszenz und diskreten Absorptionslinien, Inhibitoreinsatz und Gassprunganalysen). Die Kooperation mit dem Kieler Graduiertenkolleg GRK 820 „Antioxidantien“, Sprecherin Frau Krupinska, Botanik, bringt weiterhin das Know-How für den Einsatz von Farbstoffen für ROS (reactive oxygen species), so dass die Untersuchungen auf eine breite Basis gestellt werden können. Die Suche nach geeigneten Signalen für die Infektionserkennung im Feld hat allerdings den Nachteil, dass häufig nach dem Prinzip des Schrotschusses vorgegangen werden muss, um abzustecken, wo es verwertbare Signale gibt. Das geht bei beschränktem Zeitrahmen manchmal auf Kosten der Tiefe, die man erreichen könnte, wenn man sich auf einen Effekt konzentrieren würde. Allerdings müssen dazu passende Effekte erst einmal bekannt sein, so dass sich diese Arbeit hauptsächlich mit der Suche nach solchen beschäftigen wird.



## Kapitel 2

# Stand der Forschung

Der Stand der Forschung wird in Bezug auf die beiden Zielsetzungen der Arbeit behandelt:

- Analyse der Auswirkung einer Pilzinfektion auf das photosynthetische System in Pflanzen, insbesondere auf die Wechselwirkung zwischen Chloroplasten, Peroxisomen und Mitochondrien,
- Suche nach Parametern, die sich für die Erfassung des Pilzbefalls vom fahrenden Fahrzeug eignen, und Installation sowie Erprobung eines Messsystems auf einem Traktor.

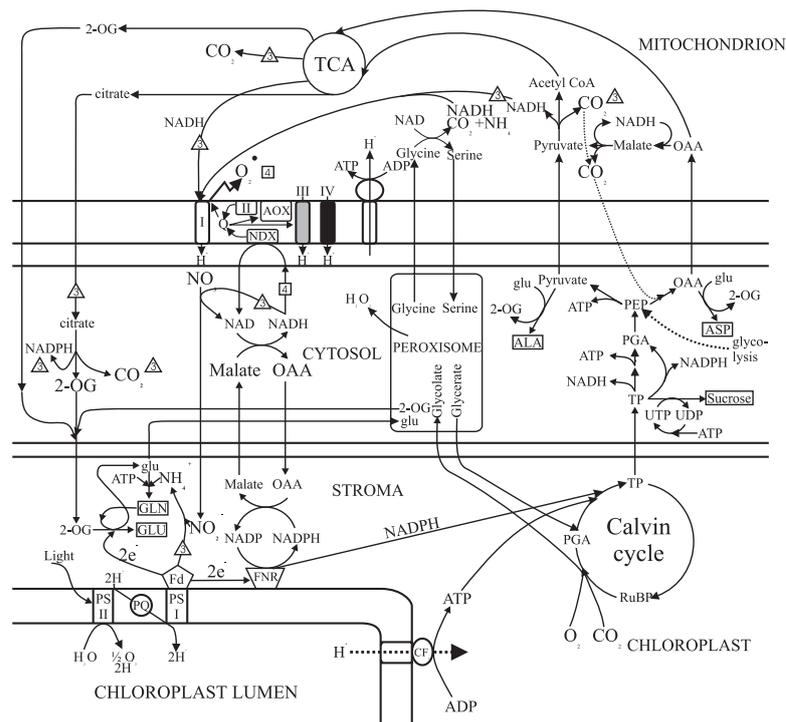
Es gibt zahlreiche Untersuchungen, die sich mit der Wirkung von Pathogenen auf die Photosynthese befassen. Sehr häufig sind Studien mit Viroiden (Jakob et al., 1997) oder Viren (Osmond et al., 1998). Aber es existieren auch mehrere Arbeiten zum Pilzbefall. Die generelle Beobachtung ist eine Reduzierung der photosynthetischen Aktivität, ausgedrückt durch die variable Chlorophyll-Fluoreszenz (Koch et al., 1994; Levall und Bornman, 2000; McAinsh et al., 1990; Raggi, 1995), teilweise in Zusammenhang mit der Verfügbarkeit von Nährstoffen wie Calcium oder Magnesium (Schwab et al., 1993), Phosphor (Zulu et al., 1991) und Stickstoff-Form (Cruz et al., 1993). Wichtig für die Früherkennung ist, dass diese Reduktion bereits in befallenen, aber noch grünen Blättern auftritt (Bastiaans, 1991; Hammes, 2000). Sowohl beim Befall von Weinblättern mit Viroiden (Jakob et al., 1997) als auch von Pfirsichblättern mit *Taphrina deformans* (Raggi, 1995) findet man eine Stimulation der Respiration (auch der Dunkelrespiration, Bastiaans, 1991), während die CO<sub>2</sub>-Fixierung sogar negative Werte annimmt (Raggi, 1995). Der Anstieg der Respiration fällt mit einer 2- bis 3-fachen Stimulation der Expression der mitochondrialen ATPase zusammen (Madrid et al., 1999). Peroxisome lösen sich teilweise von den Chloroplasten und den Mitochondrien und versammeln sich am Plasmalemma, offenbar um Radikale zur Abwehr zu liefern (Coulomb et al., 1996). Zuckerman et al. (1997) dagegen finden, dass die CO<sub>2</sub>-Fixierung bei mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern bei den noch grünen Blattteilen pro Fläche steigt, als ob der Verlust aktiver Blattteile kompensiert werden sollte.

Doch auch für andere Mechanismen gibt es Hinweise: Plasmalemma-Redoxsysteme (Vannacker et al., 1998) spielen offenbar keine allzu große Rolle bei der Pathogenabwehr (Lüthje et al., 2000). Aber es gibt Hinweise auf die Beteiligung von exozellulären Enzymen wie Germin/Oxalate-Oxidasen und Amine-Oxidasen, die ROS als Antwort auf Pathogen-Infektion produzieren (Bolwell und Wojtaszek, 1997). Hückelhoven et al. (2000) haben mit NBT (nitroblue tetrazolium) im oxidativen Burst ROS-Erzeugung im Apoplasten gezeigt.

Baker et al. (2000) berichten, dass die ROS-Produktion bei Infektion durch Bakterien mit dem Cytochromweg in den Mitochondrien zusammenhängt und damit doch die aus dem N-Form-Projekt (Sa359/13, Guo et al., 2005) bekannten Mechanismen in Betracht gezogen werden müssen.

Diese Effekte zeigen, dass sich bei einer Infektion der Stoffwechsel des Wirtes verändert. Tiefere Kenntnisse über das Umschalten auf andere Synthesewege gibt es jedoch noch nicht.

Konzepte für das Verstehen dieser Vorgänge findet man in den neueren Arbeiten bei der Kopplung zwischen Photosynthese, Photorespiration und Atmung (Backhausen et al., 1994; Krömer, 1995; Noctor und Foyer, 1998). Sie führten bei Arbeiten der eigenen Gruppe (Zhu et al., 2000; Bendixen et al., 2001; Guo et al., 2005) über die Untersuchung der Wirkung der N-Form bei nitrat- oder ammonium-ernährten Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) zur Hypothese, dass die N-Form-abhängige Schädigung durch Starklicht mit der Benutzung unterschiedlicher Wege der Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung zusammenhängt, die für die Pflanze unterschiedlich riskant hinsichtlich der Generation von Radikalen sind. Im Sinne der Arbeit von Noctor und Foyer (1998) liegen die Unterschiede in der Art des Redox-Exportes aus den Chloroplasten, der dem Bedarf an C-Skeletten für die Proteinsynthese und dem Ausgleich der NADPH/H<sup>+</sup>-ATP-Bilanz angepasst wird (siehe Abb. 2.1).



**Abbildung 2.1:** Darstellung der Kopplung zwischen Photosynthese, Photorespiration und Atmung in Hinblick auf die Unterschiede bei der Stickstoffernährung; nach Guo et al. (2005).

Für die Existenz ähnlicher Mechanismen bei Pilzinfektion sprechen einige Beobachtungen: Raggi (1995) zum Beispiel findet bei Pilzbefall die bereits erwähnte Erhöhung der Respiration, eine sehr starke Abnahme der CO<sub>2</sub>-Fixierung im Gegensatz zu einem sehr geringen Effekt auf die über Chlorophyll-Fluoreszenz gemessene photosynthetische Effektivität. Der Autor versucht, diesen scheinbaren Widerspruch mit CO<sub>2</sub>-Refixierung aus der bereits oben erwähnten stimulierten Respiration (ATPase Expression, Madrid et al., 1999) zu erklären.

Doch im Lichte neuerer Hypothesen (Noctor und Foyer, 1998) und der Befunde der eigenen Arbeitgruppe, dass zum Beispiel bei CO<sub>2</sub>-Mangel der Fluss durch die ETC erhalten bleibt (Chlorophyll-Fluoreszenz und photoakustisch gemessene O<sub>2</sub>-Entwicklung an PS II, Schinner et al., 2001a), während die Netto-O<sub>2</sub>-Entwicklung (Clark-Elektrode) auf null geht, kann auch angenommen werden, dass der photosynthetische Elektronenfluss direkt, z. B. über den Malat-Shuttle, in die Mitochondrien geleitet wird und kaum noch zum Calvin-Zyklus fließt. Dies unterstützt die Hypothese, dass die befallene Pflanze die CO<sub>2</sub>-Fixierung einstellt, da soviel ATP für Reparaturen und Pilzabwehr gebraucht wird, dass das ATP aus der Thylakoid-Energetisierung nicht mehr für den Calvin-Zyklus zur Verfügung steht und dann die exportierten Redox-Äquivalente der ETC (z. B. über den Malat-Shuttle, Backhausen et al., 1994; Reumann et al., 1994) weiteres ATP (erhöhte Respiration) in den Mitochondrien erzeugen.

Die Ähnlichkeit zu diesen Ergebnissen aus dem N-Form-Projekt erstreckt sich selbst auf solche Details, dass das mit HPLC gemessene Antennen-Xanthophyll Zeaxanthin bei Befall fällt und Violaxanthin steigt (Levall und Bornman, 2000). Bei den Untersuchungen der eigenen Gruppe zum N-Form-abhängigen Lichtstress wurde die Unterdrückung der Zeaxanthin-Bildung bei ammonium-ernährten Pflanzen (Bendixen et al., 2001) in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Neubauer und Yamamoto (1994) damit erklärt, dass die Entgiftungsreaktionen bei erhöhter Radikalbildung so viel Ascorbat verbrauchen (Zhu et al., 2000), dass dies für die Zeaxanthin-Bildung in den Antennen fehlt (Bendixen et al., 2001). Eine Erniedrigung des Ascorbatgehaltes in infizierten Blättern fanden auch Jakob et al. (1997). Hierzu scheinen Ergebnisse zum starken Auftreten von Radikalen sowohl bei Infektion mit Viroiden (Jakob et al., 1997) als auch bei Pilzen (Coulomb et al., 1996; Vanacker et al., 1998) zu passen. Vanacker et al. (1998) fanden im Blattapoplasten von Hafer unter Einfluss des Pilzbefalls (*Blumeria graminis*) starke Änderungen von Superoxid-Dismutase (SOD), Catalase, Ascorbat-Peroxidase, Dehydroascorbat-Reductase, Monodehydroascorbat-Reductase und Glutathion-Reductase, entsprechend den Ergebnissen der eigenen AG von ammonium-ernährten Pflanzen (Zhu et al., 2000).

Allerdings kann die physiologische Bedeutung der jeweiligen Effekte bei Pilzbefall und N-Form-Anpassung verschieden sein. Nach der in Zhu et al. (2000) vertretenen Hypothese hängt die Art der Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung an den Erfordernissen einer ausgewogenen ATP/NAD(P)H-Bilanz und an der Bereitstellung von C-Skeletten für die Protein-Synthese. Bei Pilzbefall kann die Ursache für ähnliche messtechnische Befunde die Aktivierung der Radikalerzeugung zur Pathogenabwehr (Ascorbat, Lipidperoxidation, Glutathion) oder eine vom Pathogen stimulierte Bereitstellung von Biomasse (Respiration) sein.

Doch gerade diese Unterschiede ermöglichen eine Beleuchtung ähnlicher Befunde von verschiedenen Seiten und können deshalb sehr hilfreich für das Verstehen der auftretenden Anpassung der Stoffwechselwege sowohl bei N-Form-abhängiger Stressresistenz als auch beim Pathogen-Befall sein. Die Vermutung solcher Ähnlichkeiten wird dadurch gestützt, dass die mehr Radikale erzeugenden ammonium-ernährten Pflanzen (Zhu et al., 2000) auch resistenter gegen Pilzbefall sind (Cruz et al., 1993).

Auf dem Gebiet der Signalstoffe, die mit einer Pilzinfektion einhergehen, gibt es eine große Zahl neuer Veröffentlichungen. Nach wie vor eine große Rolle spielen globale Signal-Moleküle wie Jasmon-Säure (JA), Salicyl-Säure (SA) (Berrocal-Lobo et al., 2002; Bostock et al., 2001; Stotz et al., 2002), auch Abscisin-Säure (ABA) und Äthylen. Aber auch die Kooperation von Äthylen mit dem Äthylen-Generator Ethephon (Agrawal et al., 2002), dem Ethylene-Response-Factor (ERF1) (Berrocal-Lobo et al., 2002), von Salicyl-Säure mit dem PR-1-Transcript (Nawrath et al., 2002) und von Jasmonat mit dem Rice-Peroxidase-(OsPOX)-Gen werden behandelt. Daneben werden auch andere Signalstoffe erörtert wie Oligosaccharide (Bouarab et al., 2001).

Anschluss an die weit fortgeschrittene Forschung an tierischen Signalketten finden Arbeiten, die sich mit Protein-Kinase-Kaskaden beschäftigen, zum Beispiel Mitogen-Activated-Protein-Kinasen-Kaskaden (MAPK) (Cardinale et al., 2002; Link et al., 2002; Nuernberger und Scheel, 2001; Zwerger und Hirt, 2001) und dazu noch WRKY22/WRKY29 transcription factors (Arai et al., 2002), Calcium-Dependent-Protein-Kinasen (CDPKs) (Lee und Rudd, 2002), Serine Threonine Kinase Pto (Peart et al., 2002; Sessa und Martin, 2000) und Rx (a CC-NBS-LRR protein) (Peart et al., 2002).

Resistenzgene sind z. B. bei mit Mehltau befallener Gerste entdeckt worden (Hückelhoven et al., 2000). Dort wird auch die Entstehung von ROS mit den Farbstoffen NBT (nitroblue tetrazolium,  $O_2^{\cdot-}$ ) und DAB (diaminobenzidine,  $H_2O_2$ ) nachgewiesen.

Dieser breiten Literatur zu Signalstoffen steht kaum etwas an molekularbiologischen Arbeiten zum pathogen-induzierten Umsteuern des Redoxflusses nach PS I entgegen. Bemerkenswert ist die Arbeit von Narusaka et al. (2003), in der mit cDNA-Microarray-Technologie das Einschalten von Genen in *Arabidopsis thaliana* und in der Mutante *Arabidopsis pad3-1* bei Infektion mit *Alternaria brassicicola* untersucht wurde.

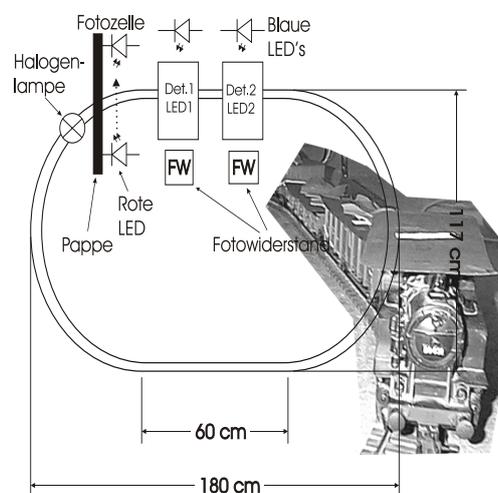
In diesem Zusammenhang sind die Befunde von Maxwell et al. (2002) wichtig, dass durch den mitochondrialen Inhibitor Antimycin A sechs cDNAs, die denen bei Pathogenbefall ähnlich sind, induziert werden. Möglicherweise bedeutet dies, dass reduzierter Export aus den Chloroplasten in die Mitochondrien ebenfalls Pathogenbefall anzeigende cDNA anschaltet.

## 2.1 Eigene Vorarbeiten

Im Rahmen der Diplomarbeit Hammes (2000) wurden in Voruntersuchungen zum Verhalten der Chlorophyll-Fluoreszenz bereits einige Ergebnisse gewonnen: Ein Vergleich der photosynthetischen Exitonenflüsse (Fluorescence Clamp, Schinner et al., 2000) zeigt bei den Induktionskurven mit sättigenden Blitzen bei befallenen Weizenblättern Unterschiede in den photochemischen Elektronenflüssen und der thermischen Deaktivierung. Auch konnten bei den Fluoreszenz-Signalen  $F_M$  und  $F_0$  unterschiedliche Werte bei gesunden und infizierten Blättern gemessen werden. Besonders ermutigend war, dass in infizierten Blättern, bei denen noch kein Befall mit dem bloßen Auge sichtbar war, bereits Infektionssymptome in den Messungen auftraten. Ein Blindversuch mit Blättern, die nur für infiziert gehalten wurden, obwohl sie gesund waren, ergab keine Unterschiede.

Wie in der Einleitung schon angesprochen, wurde in der Diplomarbeit Hammes (2000) auch gezeigt, dass die Messung der zeitlich variablen Chlorophyll-Fluoreszenz vom fahrenden Traktor aus prinzipiell machbar ist:

- Statt eines Traktors wurde ein Aufbau mit einer Märklin-Spur-I-Bahn verwendet, wie Abb. 2.2 zeigt.
- Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz aus einem Meter Abstand sind problemlos möglich.
- Der schwankende Abstand Pflanze–Detektor, welcher durch einen fahrenden Trecker verursacht wird, kann durch Normierung mit dem Reflexionssignal korrigiert werden.
- Für zeitaufgelöste Messungen wurden hintereinander angeordnete Detektoren verwendet. Über eine Kreuzkorrelation können die Messungen der einzelnen Blätter einander zugeordnet werden.
- Mit diesem Aufbau konnte in der Abklingkurve des Chlorophyll-Fluoreszenz-Yields nach Beleuchtung bei einem nicht befallenen und einem mit *Septoria tritici* befallenen Blatt Unterschiede gemessen werden.



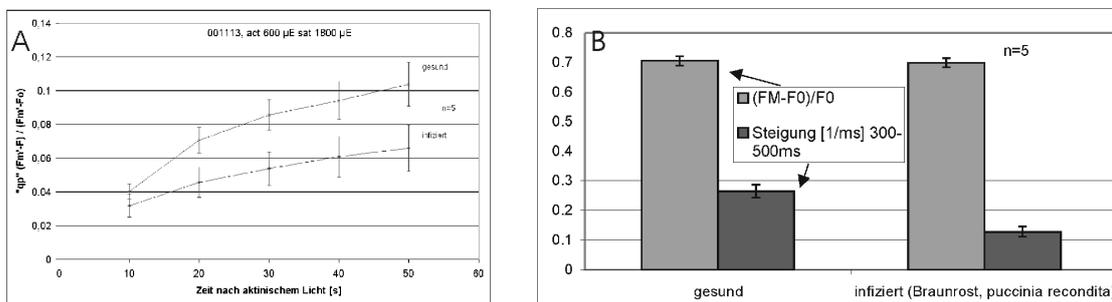
**Abbildung 2.2:** Der Gleisaufbau zur Simulation der Messung vom fahrenden Traktor und der beladene Zug (Hammes, 2000).

## 2.2 Messungen von Eiko Thiessen

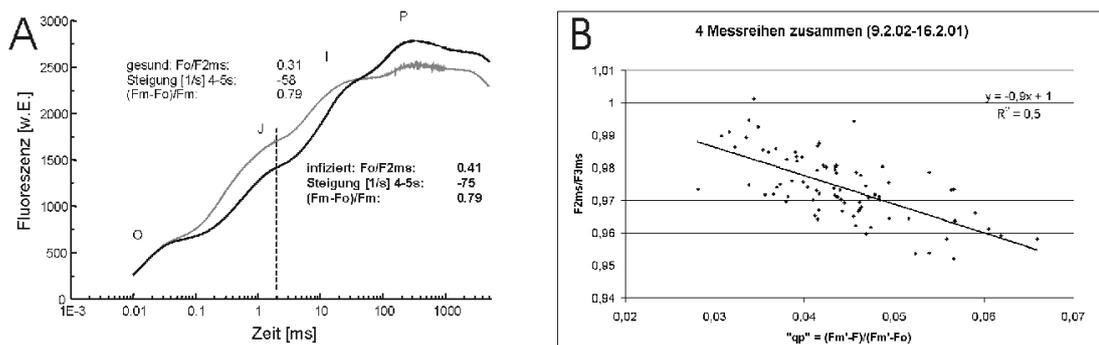
Auch Vorversuche von Eiko Thiessen im Institut für Landwirtschaftliche Verfahrenstechnik der CAU unter Professor Heege zeigten bei Pilzbefall Unterschiede in den Chlorophyll-Fluoreszenz-Signalen:

Der im klassischen Light-Clamp (PAM) gemessene photochemische Fluss ist bei Befall mit *Septoria tritici* geschwächt, wie Abb. 2.3A zeigt.

Interessant ist auch der Verlauf von Fluoreszenzparametern im frühen Stadium der Infektion bei *Puccinia recondita* (Abb. 2.3B): Die  $F_M$ - und  $F_0$ -Messungen (linke Säulen) zeigen noch keinen Unterschied, während die relative Steigung der Kinetikkurve sich jedoch schon ändert (Abb. 2.3B rechte Säulen). Dies zeigt sich auch in Abb. 2.4A im Detail: Gesunde Blätter haben einen steileren Verlauf beim Einschalten des aktinischen Lichtes als infizierte (Abb. 2.4A, links). Dies ist auch im abfallenden Teil der Kinetik zu sehen (Abb. 2.4A, rechts) sowie sogar im Millisekundenbereich (0,1 bis 10 ms in Abb. 2.4A links).



**Abbildung 2.3:** (A) Photochemischer Fluss in gesunden und mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern nach Anschalten des aktinischen Lichtes, gemessen mit dem Plant Efficiency Analyzer von Hansatech (Thiessen, unpublished). (B) Veränderte Fluoreszenzkinetik bei mit *Puccinia recondita* infizierten Weizenblättern gegenüber den gesunden (Thiessen, unpublished).



**Abbildung 2.4:** (A) Veränderung der Induktionskurven bei Befall mit *Septoria tritici* (Infektion 5 Wochen vorher) im Millisekundenbereich (Heege et al., 2001). OJIP bezeichnet charakteristische Zwischenniveaus (Strasser et al., 1995). (B) Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen den Messungen im Millisekundenbereich (Quotient der Fluoreszenz bei 2 und 3 ms:  $F_{2ms}/F_{3ms}$ ) und photochemischem Quenching ( $q_p$ ), wobei  $F_0$  allerdings vor der Zugabe des aktinischen Lichtes gemessen wurde und  $F$  am Ende einer 30-sekündigen Beleuchtung mit  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Sättigungsblitze:  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Thiessen, unpublished).

Abbildung 2.4A zeigt, dass möglicherweise befallsinduzierte Unterschiede im Millisekundenbereich bestehen. Der Quotient aus den Antworten bei 2 ms zu  $F_0$  unterscheidet sich bei gesunden

und infizierten Pflanzen. Veränderungen dieser Art bei Algen wurden in Kooperation mit dem FTZ Büsum quantitativ auf der Grundlage eines Modells beschrieben (Hintze, 1999). Abbildung 2.4B zeigt, dass möglicherweise eine Kopplung zwischen dem schnellen und dem langsamen Bereich besteht.

## 2.3 Nachweis von pilzlichen Pflanzenkrankheiten des Weizens am Beispiel des Erregerkomplexes *Fusarium* spp. durch molekulare Techniken

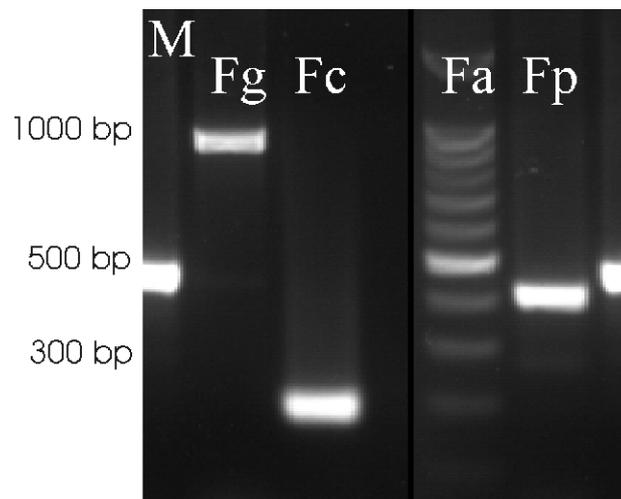
Mit dem DFG-Forschungsprojekt Ve 156/2 (Thema „Molekulare Analyse der genetischen Struktur und Diversität deutscher und europäischer Populationen von *Septoria tritici*, dem Erreger einer Blattdürre an Weizen“, Schnieder, 1998; Schnieder et al., 1998, 2001) konnte durch die Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Jung (Institut für Pflanzenzüchtung, CAU Kiel) die Etablierung molekularer Nachweismethoden von pilzlichen Erregern am Institut für Phytopathologie (AG Verreet) realisiert werden. Dr. Frank Schnieder war Bearbeiter des Forschungsprojektes und ist am Institut weiterhin als Wissenschaftlicher Assistent tätig.

Die Problematik einer sicheren Diagnose phytopathogener Pilze ist durch die bei einigen Erregern auftretende Inkubationszeit bis zum Auftreten erster sichtbarer Befallssymptome begründet. Besonders die Erreger *Septoria tritici*, *Septoria nodorum* und *Fusarium* spp. erschweren durch ihre lange Inkubationszeit eine frühzeitige Diagnose und damit geeignete Bekämpfungsmaßnahmen.

Gleichzeitig erschwert diese Problematik aber auch die Interpretation der Fluoreszenzmessungen. Nur über ein parallel laufendes System der quantitativen Erfassung des oder der Pathogene können die Aussagen der Fluoreszenzmessungen verifiziert werden. Als zur Zeit geeignete Methode erscheint die Quantifizierung der Erreger durch eine PCR. Diese Methode ist neben anderen molekulardiagnostischen Verfahren am Institut für Phytopathologie seit langem etabliert.

In den unten aufgeführten Ergebnissen von Voruntersuchungen wurde ein PCR-Verfahren für den qualitativen und ansatzweise quantitativen Nachweis von Fusariosen an Winterweizen ausgearbeitet und etabliert.

Für die verschiedenen *Fusarium* spp. stehen spezifische Primer für die PCR zur Verfügung (Abb. 2.5). Diese Primer ermöglichen mit Hilfe der PCR die eindeutige Erkennung des Pilzbefalls.



**Abbildung 2.5:** Nachweis der wichtigsten Weizenfusariosen durch eine PCR mit pathogenspezifischen Primern (AG Verreet). M = Größenmarker, Fg = *Fusarium graminearum*, Fc = *Fusarium culmorum*, Fa = *Fusarium avenaceum*, Fp = *Fusarium poae*.

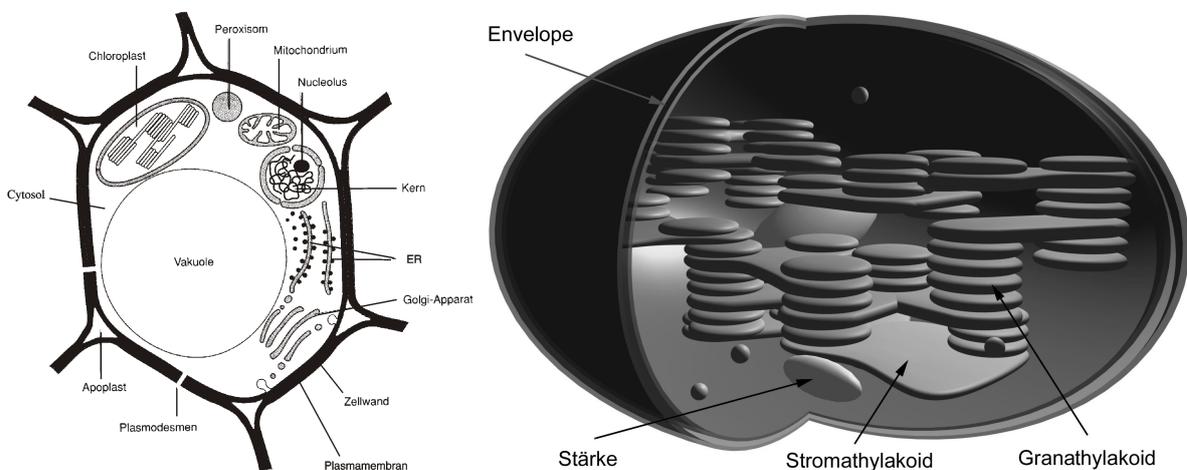
## Kapitel 3

# Photosynthese und Pflanzenstoffwechsel

Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit ist die Interaktion von Pflanzen mit Pilzen. Da zum Verständnis der Prozesse, die für diese Arbeit von Bedeutung sind, Kenntnisse über den Aufbau einer Pflanzenzelle und der beteiligten Stoffwechselwege nötig sind, wird in diesem Kapitel ein kurzer Überblick gegeben.

### 3.1 Aufbau einer Pflanzenzelle

Abbildung 3.1 zeigt auf der linken Seite die schematische Darstellung einer Pflanzenzelle. Diese ist von einer Zellwand und einer Plasmamembran umgeben, die auch als Plasmalemma bezeichnet wird. In ihrem Inneren enthält die Zelle verschiedene Organellen. Dadurch wird die Zelle in verschiedene Räume (subzelluläre Kompartimente) unterteilt. Jede dieser Organellen hat eine bestimmte Stoffwechsellaufgabe.



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung einer Pflanzenzelle (Heldt, 2003) und eines aufgeschnittenen Chloroplasten nach Libbert (1987).

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 „Abfalldeponie“ der Zelle. Die *Chloroplasten* bilden das nächstgrößere Kompartiment. 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 ermöglichen so den Stoffaustausch. Der so entstandene cytoplasmatische Verbund innerhalb einer Pflanze wird *Symplast* genannt im Ge-

gensatz zum *Apoplasten*, der vom gesamten extrazellulären Raum innerhalb eines pflanzlichen Gewebes gebildet wird. Im Folgenden wird detaillierter auf die Kompartimente Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen (im Rahmen der Photorespiration) eingegangen, da sie für diese Arbeit von Bedeutung sind.

## 3.2 Chloroplasten

In grünen Pflanzen findet Photosynthese in den Chloroplasten der Pflanzenzelle statt. Jede Zelle enthält bis zu 400 davon in ellipsoider Form mit einem Volumen von  $40 \mu\text{m}^3$ . Abbildung 3.1 zeigt auf der rechten Seite einen Schnitt durch einen Chloroplasten.

Im Inneren des Chloroplasten befindet sich eine 7 nm dicke Lipiddoppelschicht, die als *Thylakoidmembran* bezeichnet wird. Sie kommt in gestapelter und ungestapelter Form vor. Die ungestapelten Schichten werden *Stromathylakoide* genannt, die gestapelten heißen *Granathylakoide* (siehe Abb. 3.1 rechts). Die Thylakoidmembran ist in sich geschlossen und teilt den Innenraum des Chloroplasten in zwei Bereiche auf: das äußere *Stroma* und das innere *Lumen*. Die Thylakoide enthalten die Komponenten des Photosyntheseapparates, die für die Energieumwandlung zuständig sind (Junge, 1975; Renger et al., 1987):

- lichtsammelnde Proteine (LHC),
- Photosysteme I und II (PS I und PS II),
- Elektronentransportkette (ETC),
- Elektroenzym ATPase.

Dabei befinden sich die PS I im *Stroma*-Bereich der Thylakoiden und die PS II im *Grana*-Bereich (Danielsson et al., 2004; Heldt, 2003). Das Stroma des Chloroplasten enthält die Komponenten, die für die Substanzumwandlung verantwortlich sind:

- Enzyme des Calvin-Zyklus,
- Enzyme weiterer Stoffwechselprozesse, wie Mehler-Reaktion und Stickstoff-Stoffwechsel.

Die Chloroplasten sind von einer Außenmembran, der *Envelope*, umgeben und beweglich im Cytosol eingelagert, in dem sich auch die *Mitochondrien*, die „Kraftwerke“ der Zelle, befinden.

### 3.2.1 Photosysteme

Das zur Photosynthese notwendige Licht wird in den Photo- bzw. Antennensystemen von PS I und PS II absorbiert. Die Antennenpigmente werden aus Chlorophyll-Molekülen gebildet, die in der Lage sind, Photonen unterschiedlicher Wellenlängen zu absorbieren. Ein Photosystem besteht aus ca. 300 Chlorophyllmolekülen a (*Chl a*), weiteren Photorezeptormolekülen (*Chl b* und Carotinide) und einem Reaktionszentrum (RZ), in dem die von der Lichtenergie angetriebene Trennung von Ladungen stattfindet.

Die Reaktionszentrumsmoleküle sind spezielle *Chl a*, die im Falle von PS I bei 700 nm (*P700*) und im Falle von PS II bei 680 nm (*P680*) ihr Absorptionsmaximum haben. Zur Ladungstrennung wird die von den Antennenpigmenten absorbierte Energie benötigt.

Der genaue Prozess der Übertragung des Anregungszustandes (das *Exziton*, was dem  $S_1$ -Zustand des Chlorophyll-Moleküls entspricht, siehe Diagramm in Abb. 4.5) aus der Antenne in das RZ ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen mit Hilfe der *Picosekunden-Fluoreszenz-Messtechnik* (Dau und Sauer, 1996).

Beim „Shallow Trap“-Modell wird davon ausgegangen, dass sich das Exziton frei im Antennenkomplex bewegt. Dabei kommt es nach Messungen von Leibl et al. (1989) ca. 60-mal am RZ vorbei, bevor es dort eine Ladungstrennung bewirken kann. Voraussetzung dafür ist ein „offener“

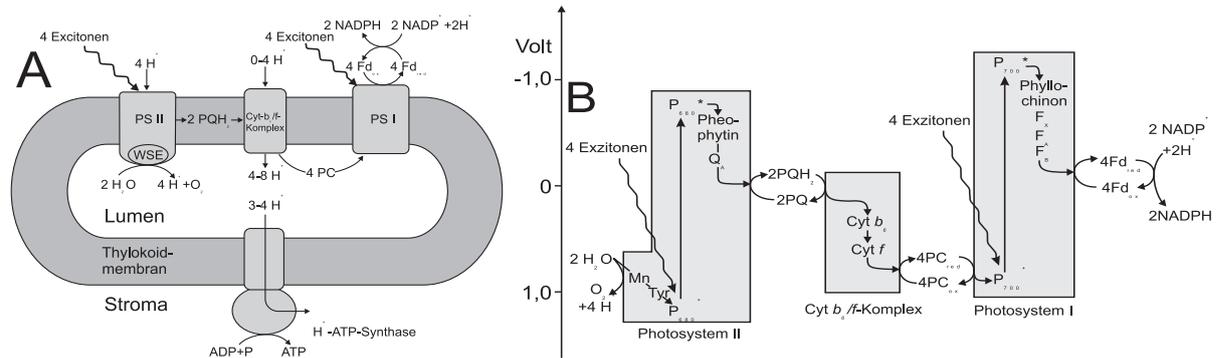
(reduzierter) Zustand des  $P680$ . Bei einem oxidierten  $P680(P680^+)$  kann die Anregungsenergie hingegen nicht genutzt werden. Entweder verschwindet das Exziton dann durch *thermische Deaktivierung* oder durch *Fluoreszenzabstrahlung*. Beim sogenannten „connected-unit“-Modell (Geacintov und Breton, 1987) kann der Anregungszustand auf einen anderen Antennenkomplex übertragen und dort von einem reduzierten RZ eingefangen werden.

Auch bei offenen Reaktionszentren kann das Exziton über die genannten alternativen Prozesse (thermische Deaktivierung oder Abstrahlung von Fluoreszenz) deaktiviert werden. (Die Verteilung der einzelnen Prozesse wird im Zusammenhang mit dem Topfmodell in Kapitel 4.4.2 besprochen.)

Die Antennenfläche wird durch den „Light-Harvesting-Complex“ (LHC) vergrößert, der den größten Teil des Lichtes absorbiert und auf die beiden Photosysteme überträgt. Ein Teil dieses Antennenkomplexes ist beweglich und ermöglicht eine Veränderung der relativen Antennengröße von PS I und PS II. Dadurch kann die Pflanze sich an die Umwelt anpassen und die Energieübertragung auf die beiden Photosysteme regeln und ausgleichen (sog. „State Transitions“).

Eine weitere Möglichkeit der Pflanze, bei zuviel Licht die überschüssige Energie loszuwerden, ist die verstärkte Umsetzung der Exzitonen in Wärme, die sog. thermische Deaktivierung.

### 3.2.2 Elektronentransportkette



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der Elektronen-Transport-Kette (ETC) in den Chloroplasten (A) Thylakoid-Membran mit den Photosystemen und der ATPase. (B) Sogenanntes Z-Schema: Die Schritte der ETC sind nach ihrem Redox-Potential aufgetragen. Details im Text. Nach Heldt (2003).

Mit Hilfe der Energie des absorbierten Lichtes werden am wasserspaltenden Enzym (WSE - water splitting enzyme) Elektronen abgespalten, welche über eine Folge von Redox-Reaktionen schließlich auf die Akzeptorseite von PS I gebracht werden. Diese Kette bezeichnet man als Elektronentransportkette (ETC - electron transfer chain); dabei werden auch Protonen von der Stroma- auf die Lumenseite transportiert. Abb. 3.2 zeigt die Abfolge der Reaktionen.

Nach Absorption eines Photons beginnt die Kette mit der Anregung des Reaktionszentrums  $P680$  von PS II. Das WSE spaltet zwei Moleküle  $H_2O$  aus dem Lumen in Sauerstoff, vier Protonen und vier Elektronen. Der Akzeptor Pheophytin (Pheo) wird vom  $P680$  reduziert (Abb. 3.2B) und wird dann reoxidiert durch die Weitergabe des Elektrons an den primären Chinonakzeptor, den Quencher  $Q_A$ , welcher das aufgenommene Elektron an den sekundären Chinonakzeptor  $Q_B$  abgibt.  $Q_B$  kann nun im zweifach negativ geladenen Zustand das PS II verlassen. Nach Aufnahme von zwei Protonen aus dem Stroma tritt es als Plastohydrochinon ( $PQH_2$ ) in den Plastoquinonpool ein (PQ-Pool). Dieser stellt einen Zwischenspeicher zwischen PS II und den nachfolgenden Komponenten der ETC dar.

$PQH_2$  diffundiert durch die Thylakoidmembran zum Lumen, wo es die beiden Protonen abgibt. Die Erhöhung der Protonenkonzentration im Lumen, es sind dort noch zusätzlich die

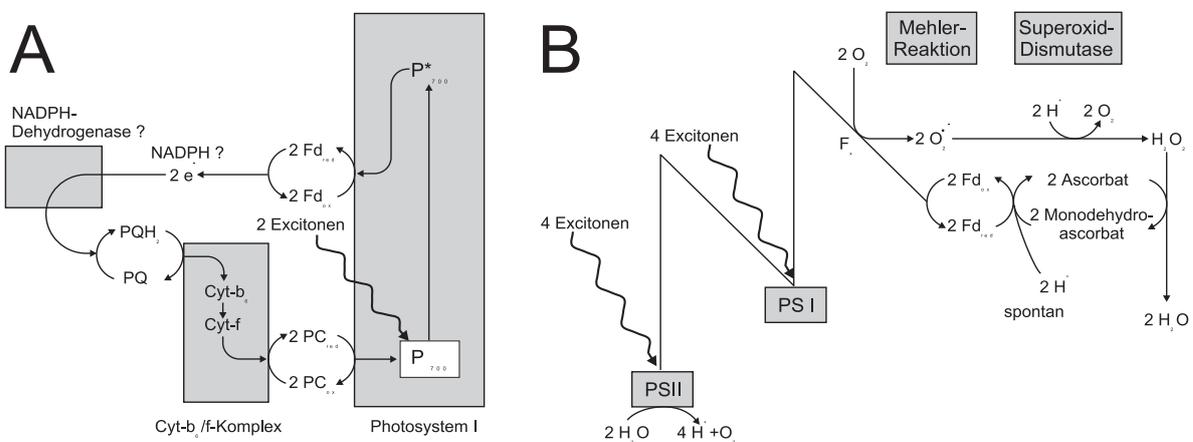
4 Protonen aus der Wasserspaltung vorhanden, führt zum Aufbau eines pH-Gradienten über der Thylakoidmembran. Die daraus resultierende freie Reaktionsenthalpie ermöglicht über eine inverse Protonenpumpe (ATPase) die Synthese des ATP aus ADP und Phosphat (Mitchell, 1977; Witt, 1979). Zur Erzeugung eines ATP werden 3–4 Protonen benötigt (Noctor und Foyer, 1998).

Die Reoxidation von PQ erfolgt über den Cytochrom- $b_6/f$ -Komplex. Das aufgenommene Elektron gelangt in den Plastocyanin-Pool (PC). Das Reaktionszentrum  $P700$  von PS I übernimmt die Elektronen und führt mit zusätzlicher Lichtenergie eine weitere Ladungstrennung durch. Über Zwischenschritte ( $A_x$ ) wird schließlich Ferredoxin (Fd) reduziert. Das Fd gibt seine Ladung an das Enzym Ferredoxin-NADP-Reduktase weiter, welches NADPH aus  $\text{NADP}^+$  und  $\text{H}^+$  synthetisiert.

Bei ausschließlich linearem Elektronentransport sind das 4  $\text{H}^+$  pro Elektron (und damit NADPH). Es werden also 1 bis 1,33 ATP pro NADPH erzeugt (Noctor und Foyer, 1998).

### 3.2.3 Zyklischer Elektronentransport und Mehler-Reaktion

Beim zyklischen Elektronentransport (siehe Abb. 3.3A) werden Elektronen von PS I über den Plastoquinonpool (PQ) wieder in die Elektronentransportkette gebracht (Harbinson und Foyer, 1991; Katona et al., 1992; Heldt, 2003). Es kann durch den damit verbundenen Transport von Protonen ins Lumen zusätzlich ATP gebildet werden, ohne dass dabei NADPH entsteht. Die physiologische Bedeutung dieses Prozesses *in vivo* ist umstritten (Krömer, 1995; Munekage et al., 2004). Der zyklische Elektronentransport kann durch Antimycin A inhibiert werden, da er von einem Cytochrom vermittelt wird (Backhausen et al., 1994; Heber et al., 1995; Heldt, 2003). Es gibt aber auch Vermutungen, dass es zwei verschiedene Wege für einen zyklischen Transport gibt, wovon einer nicht durch Antimycin A inhibiert werden kann (Joët et al., 2001).



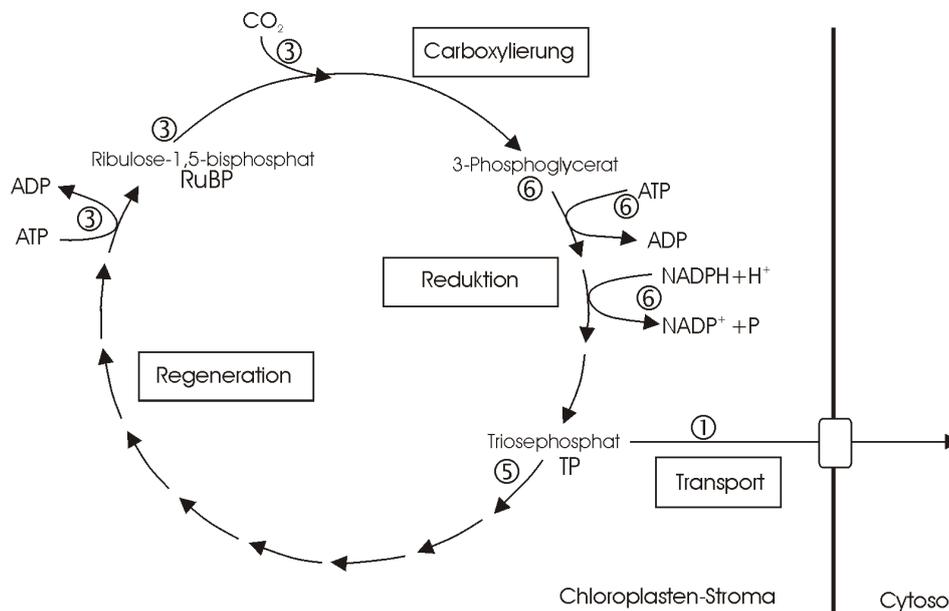
**Abbildung 3.3:** Schematische Darstellungen: (A) Zyklischer Elektronentransport zwischen PS I und dem Cyt- $b_6/f$ -Komplex. Der Zwischenweg ist nicht eindeutig geklärt. (B) Mehler-Reaktion, durch die vom Ferredoxin Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden. Dabei bildet sich Superoxid, welches über Superoxid-Dismutase und Ascorbat-Peroxidase eliminiert wird. Ein Teil der Prozesse findet sich auch in Abb. 3.2. Aus Heldt (2003).

Bei der Mehler-Reaktion (pseudozyklischer Elektronentransport, Abb. 3.3B) werden bei einem hohen Reduktionsgrad von Ferredoxin aus der Wasserspaltung stammende Elektronen unter Bildung von Radikalen auf  $\text{O}_2$  übertragen (Hormann et al., 1993, 1994). Der Prozess besteht aus mehreren Einzelreaktionen (Heldt, 2003; Schreiber und Neubauer, 1990), in deren Verlauf unter Beteiligung der Superoxid-Dismutase (SOD) Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) entsteht. Dies ist ein Zellgift, das unter Beteiligung des Enzyms Ascorbatperoxidase (APO) durch Ascorbat reduziert werden kann. Dabei wird gleichzeitig Monodehydroascorbat (MDA) gebildet. Vereinfacht kann gesagt werden, dass die Mehler-Reaktion Elektronen aus der Wasserspaltung aufnimmt

und damit zum Aufbau des pH-Gradienten beiträgt, dass sie selbst aber kein ATP verbraucht. Stöchiometrisch gesehen wird bei dieser Reaktion die Freisetzung von  $O_2$ -Molekülen im zeitlichen Mittel nicht sichtbar, da das bei der Wasserspaltung an PS II erzeugte  $O_2$  von der Mehler-Reaktion wieder verbraucht wird; man spricht deshalb auch vom „Wasser-Wasser-Zyklus“. Das Auftreten der Mehler-Reaktion *in vivo* ist auch nicht unumstritten, wahrscheinlich ist sie unter normalen Bedingungen nur zu Beginn einer Beleuchtungsphase aktiv und spielt im steady-state kaum eine Rolle (Backhausen et al., 1994; Schinner et al., 1998; Zhu et al., 2000).

### 3.2.4 Calvin-Zyklus

Die von der ETC in Form von NADPH gelieferten Reduktionsäquivalente und das ATP (siehe Abb. 3.2A) werden im Calvin-Zyklus zur  $CO_2$ -Assimilation verwendet, wie im Schema in Abb. 3.4 gezeigt. Im Gegensatz zu den ETC-Prozessen (der „Lichtreaktion“) bezeichnet man das, was im Calvin-Zyklus abläuft, als „Dunkelreaktion“, weil hierfür nicht direkt Licht nötig ist.



**Abbildung 3.4:** Schematische Darstellung des Calvin-Zyklus, die Zahlen geben die Stöchiometrien an. Aus Heldt (2003).

Das Enzym Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (RubisCO) katalysiert hierbei die Bindung von atmosphärischem  $CO_2$  an Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP), wobei 3-Phosphoglycerat entsteht. Die weiteren Schritte des Zyklus zeigt die Abb. 3.4, wobei im wesentlichen mit Hilfe der ATP-Energie und des NADPHs das RuBP regeneriert und ein Triosephosphat exportiert werden kann. Letztes stellt das primäre Produkt des Calvin-Zyklus dar, welches in weiteren Schritten verarbeitet wird, unter anderem zu Stärke. Dabei werden pro fixiertem  $CO_2$  2 NADPH und 3 ATP verbraucht. Beim oben beschriebenen linearen Elektronentransport wird also im Verhältnis zu NADPH zu wenig ATP erzeugt.

### 3.2.5 Stickstoffassimilation

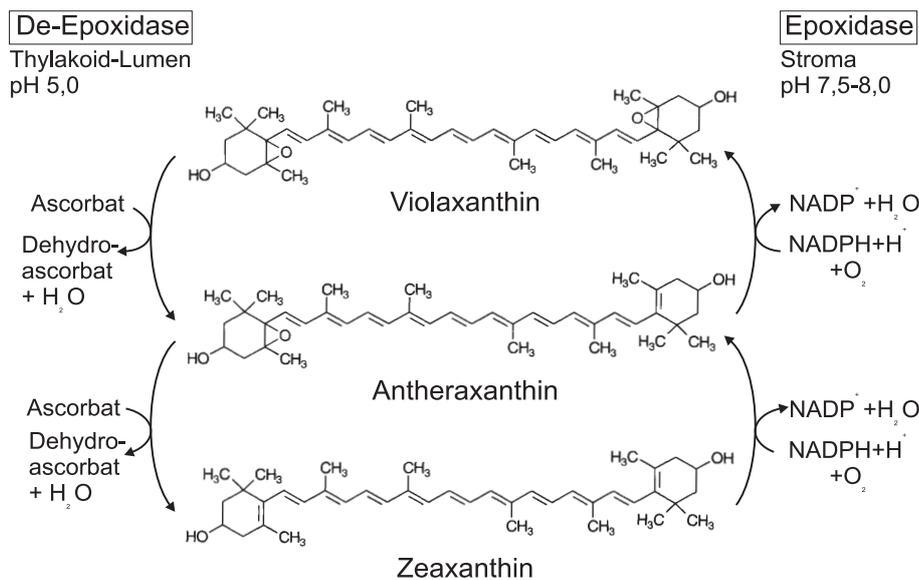
Stickstoff wird von höheren Pflanzen in Form von Nitrationen ( $NO_3^-$ ) oder Ammoniumionen ( $NH_4^+$ ) über die Wurzel aufgenommen. Die meisten Pflanzen nehmen Nitrat ins Blatt auf, verarbeiten Ammonium hingegen direkt in der Wurzel (Heldt, 2003). Die Proteinsyntheseprozesse verarbeiten ausschließlich  $NH_3$ , 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. 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.

### 3.2.6 Xanthophyll-Zyklus

Wird die Pflanze sehr hohen Lichtintensitäten ausgesetzt, kommt es zu einer Inaktivierung des photosynthetischen Apparates. Diese lichtbedingte Zerstörung wird als *Photoinhibition* bezeichnet. Diese geschieht vermutlich hauptsächlich an PS II, was zu einer Beeinträchtigung des Elektronentransportes führt.

Als Schutzmechanismus gegen Lichtstress fungiert der Xanthophyllzyklus. Die zu diesem Zyklus gehörenden drei Xanthophylle (Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin), welche man den Carotinoiden zurechnet, können ineinander umgewandelt werden, wie es Abb. 3.5 zeigt.



**Abbildung 3.5:** Schematische Darstellung des Xanthophyll-Zyklus (nach Demming-Adams und Adams III, 1996)

Zeaxanthin kann am PS II überschüssige Exitonen-Energie aufnehmen, unschädlich als Wärme abführen und so eine Schädigung des Photosystems verhindern. Wie in der Abb. 3.5 auf der linken Seite gezeigt, finden die Reaktionen des Zyklus in Richtung des Zeaxanthins bei einem pH-Wert des Lumen von 5,0 statt. Dies ist dann der Fall, wenn die Elektronen-Transportkette stark läuft, also viele Protonen über die Membran ins Lumen befördert, im Gegensatz dazu aber zu wenige Abnehmer für die Energie in Form von ATP vorhanden sind, so dass das Lumen saurer wird. Dann bindet sich die De-Epoxidase an die Membran und wird so aktiviert (Eskling et al., 2001). Der gegenläufige Prozess (rechte Seite in Abb. 3.5) findet bei einem Stroma-pH von 7,5-8 statt, also in Dunkelheit (Nayak et al., 2001). Dann werden keine Protonen mehr über die Membran transportiert und damit wird durch den Rückfluss das Stroma saurer. Auf diese Weise wird der Zyklus so geregelt, dass genau dann Zeaxanthin zur Verfügung steht, wenn überschüssige Energie abgeleitet werden muss. Die Xanthophylle können sich in der Membran bewegen und gelangen so zu den Epoxidase-Enzymen auf beiden Seiten der Membran. Für die Umwandlungsprozesse ist Ascorbat bzw. NADPH nötig, wie in der Abb. 3.5 gezeigt.

### 3.2.7 Export

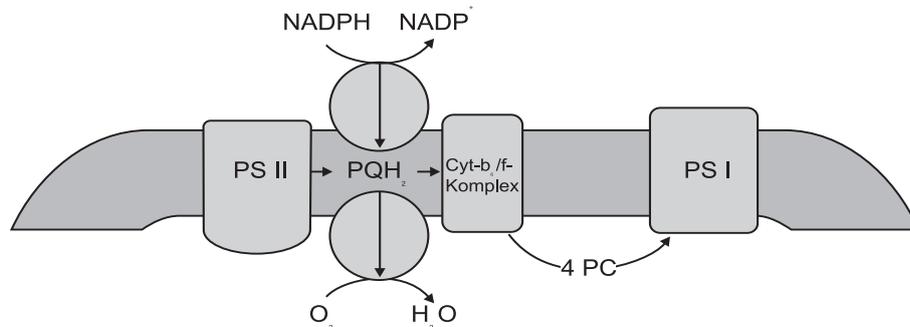
Reduktionsäquivalente von PS I können in Form von NADPH nicht nur an den Calvin-Zyklus gegeben, sondern auch über die Envelope ins Cytosol exportiert werden. NADP<sup>+</sup> und NADPH in den Chloroplasten sowie NAD<sup>+</sup> und NADH im Cytosol können allerdings die intakte Chloro-

plasten-Envelope nicht passieren. Stattdessen muss ein besonderes Transportsystem, das Malat-Oxalacetat-Shuttle (Dry et al., 1987; Hanning und Heldt, 1993), verwendet werden (Abb. 3.11). Unter einem „Shuttle“ versteht man einen Antiporter, der einen Stoff (Malat) gegen einen anderen (Oxalacetat, OAA) über eine Membran austauscht. Da die Chloroplasten über diesen Weg überschüssiges NADPH loswerden können, spricht man auch vom „Malat-Ventil“ (Backhausen et al., 1994).

Chloroplasten können reduzierende Äquivalente auch durch den Triosephosphat-3-Phosphoglycerat-Shuttle in das Cytosol liefern. Durch diesen Shuttle wird dem Cytosol mit NADH gleichzeitig auch ATP bereitgestellt .

### 3.2.8 Chlororespiration

Als Chlororespiration bezeichnet man einen Vorgang, bei dem über eine NADPH-Plastoquinone-Oxidoreductase NADPH oxidiert und Plastoquinone reduziert wird (siehe Abb. 3.6). In einem weiteren Schritt wird dann molekularer Sauerstoff reduziert, so dass die Elektronen des NADPHs auf  $O_2$  übertragen werden. Einbezogen ist nur der PQ-Pool, nicht aber der Cyt- $b_6/f$ -Komplex (Cournac et al., 2000).



**Abbildung 3.6:** Schema der vermuteten Vorgänge bei der Chlororespiration (nach Bennoun, 1994)

Die Aufgabe der Chlororespiration ist noch nicht ganz geklärt, man vermutet aber, dass sie möglicherweise bei Änderung von internen oder externen Bedingungen dazu dienen kann, das ATP/ADP- und NADPH/NADP-Verhältnis auszubalancieren (Berger et al., 1993). Dies gewinnt dann an Bedeutung, wenn während der Biogenese der Chloroplasten, wenn das PS I schon vor PS II funktionsbereit ist, oder bei der Seneszenz, wo PS II zuerst seine Aktivität vermindert, der Elektronenfluss aufrecht erhalten werden muss (Casano et al., 2000).

Auch bei der Empfindlichkeit auf Inhibitoren ist man sich nicht einig: Bei einigen Autoren ist die Chlororespiration sensitiv auf SHAM (Feild et al., 1998), bei anderen wiederum nicht (Bennoun, 2002).

Umstritten ist weiterhin die Stärke der Aktivität und damit die Bedeutung für den Stoffwechsel. Bennoun (2002) schreibt der Chlororespiration eine geringere Affinität für Sauerstoff als den Mitochondrien zu, und Peltier und Cournac (2002) schätzen die Elektronen-Flussrate der Chlororespiration auf ungefähr 2% des maximalen Flusses durch die ETC.

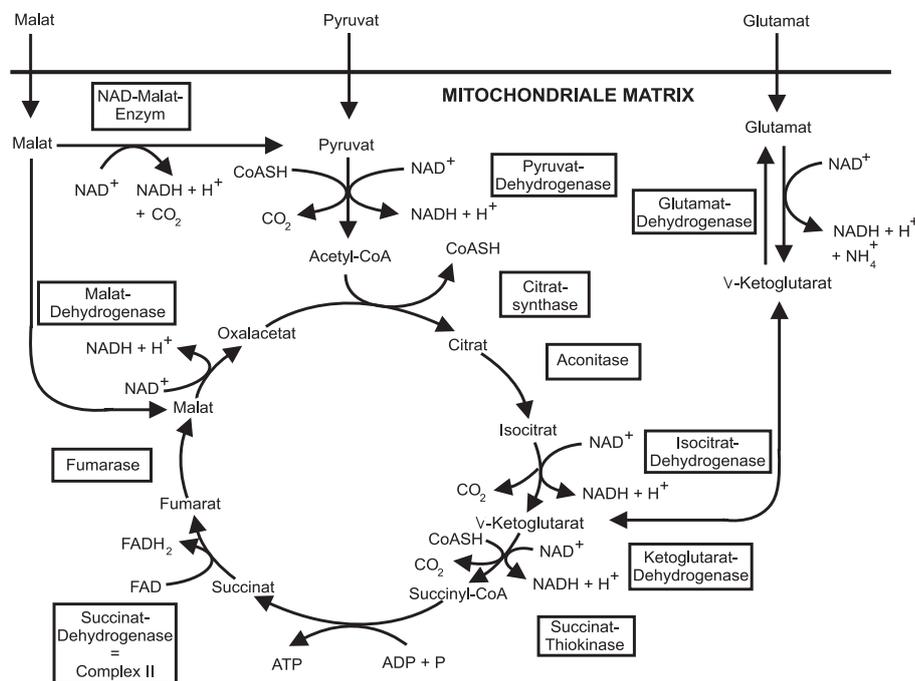
## 3.3 Mitochondrien

Mitochondrien haben eine Größe von etwa  $2 \mu m^2$  und bestehen aus einer äußeren und einer inneren Membran, dem dazwischen liegenden Intermembran-Raum und der Matrix innerhalb der inneren Membran. Sie stellen durch die aerobe Respiration die Haupt-ATP-Quelle für alle energieverbrauchenden Reaktionen im Cytosol (z.B. Wachstum) dar und versorgen den gesamten Stoffwechsel im Dunkeln, wenn die Photosynthese nicht läuft.

An der nicht-lichtgetriebenen Respiration sind hauptsächlich vier Prozesse beteiligt: die Glycolyse, der Citrat-Zyklus 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, die auch alleine ablaufen kann, wird Saccharose in Pyruvat umgewandelt, welches vom Cytosol in die Mitochondrien transportiert wird, wo es vom Citrat-Zyklus zu Kohlendioxid oxidiert wird.

### 3.3.1 Citrat-Zyklus (TCA-Zyklus)

Wie in der Abbildung 3.7 ersichtlich, werden im Citrat-Zyklus (auch TCA-Zyklus) diverse Stoffe gebildet und ineinander umgewandelt. Davon werden einige auch an anderen Stellen des Pflanzenstoffwechsels verwendet. Hauptsächlich dient dieser Zyklus aber der Energieversorgung, indem er das zu Acetat (in Form von Acetyl-CoA) umgewandelte Pyruvat zu  $\text{CO}_2$  oxidiert (Heldt, 2003). Die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente in Form von NADH dienen in der mitochondrialen Elektronentransportkette zur ATP-Erzeugung (siehe Abschnitt 3.3.2).



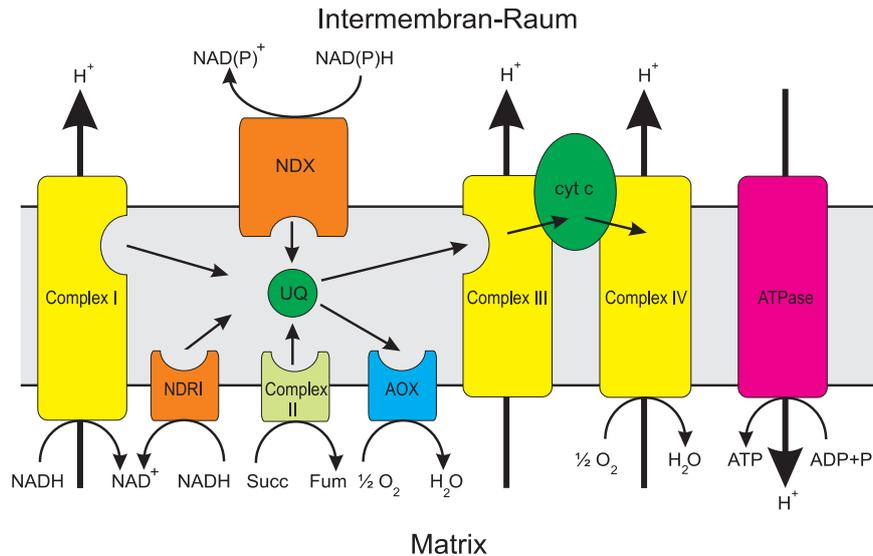
**Abbildung 3.7:** Schematische Darstellung des Citrat-Zyklus. Die Enzyme sind bis auf die Succinat-Dehydrogenase alle in der mitochondrialen Matrix vorhanden (Heldt, 2003).

Eine weitere Möglichkeit, neben Pyruvat den Citrat-Zyklus zu speisen, ist Malat, welches aus den Chloroplasten exportiert werden kann (siehe Abschnitt 3.2.7).

### 3.3.2 Elektronentransportkette und ATP-Erzeugung

Abbildung 3.8 zeigt eine schematische Darstellung der inneren Membran der Mitochondrien mit den Komplexen I-IV, dem Ubiquinonpool (UQ) und der Alternativen Oxidase (AOX). Ähnlich wie im Chloroplasten findet auch hier ein Elektronentransport sowie ein Protonentransport über die Membran zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten (hier die elektrische Spannung) statt, nur dass die treibende Kraft hier nicht die absorbierte Lichtenergie ist, sondern u.a. NADH aus dem Citrat-Zyklus.

- *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).



**Abbildung 3.8:** Innere Mitochondrien-Membran mit den Komplexen I-IV, dem Ubiquinonpool (UQ), dem Cytochrom C (cyt c), der Alternativen Oxidase (AOX), 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).

- *Komplex II* enthält das einzige Enzym des Citrat-Zyklus (Succinat-Dehydrogenase), das nicht frei löslich in der Matrix vorhanden ist. Dieser Komplex katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat während des Citrat-Zyklus (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, transferiert die Elektronen auf Sauerstoff und stellt das Ende der mitochondrialen Elektronentransportkette dar (Siedow und Umbach, 1995).

Während dieses Elektronentransportes werden an drei Orten Protonen über die innere Membran transportiert. Dabei entsteht eine elektrische Spannung von ca. -200mV, welche in der ATPase, die an sich nicht Teil der Elektronentransportkette ist, aber auch als Komplex V bezeichnet wird (Siedow und Umbach, 1995), zur Erzeugung von ATP genutzt wird. Diese Umwandlung von ADP zu ATP durch die  $F_1$ -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 3.8). Die der Matrix zugewandte NAD(P)H-Dehydrogenase kann in Konkurrenz zu Komplex I treten, um das während des Citrat-Zyklus entstandene NADH zu oxidieren. Die dem Intermembran-Raum zugewandte NAD(P)H-Dehydrogenase wird als externe NAD(P)H-Dehydrogenase (NDX) 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.

### 3.3.3 Alternative Oxidase (AOX)

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 (AOX in Abbildung 3.8) und ist nur bei den Pflanzen und Pilzen vorhanden. Bei diesem Weg werden zwei Komplexe (III und IV) umgangen, an denen Protonen für die ATP-Bildung über die Membran transportiert werden könnten.

Unter welchen Bedingungen und in welchem Umfang die Alternative Oxidase zum Einsatz kommt, ist noch nicht ganz geklärt. Lange wurde davon ausgegangen, dass sie nur 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), weil z.B. der ATP-Bedarf der Zelle gering ist, aber Stoffe aus dem Citrat-Zyklus benötigt werden (Heldt, 2003). Auch überschüssige Redox-Äquivalente aus den Chloroplasten, die über das Malat-Shuttle ins Cytosol exportiert wurden (siehe Abschnitt 3.2.7), können in die Mitochondrien-ETC eingespeist (entweder über den TCA-Zyklus oder direkt über die NDX) und dann über die AOX verbrannt werden (Padmasree und Raghavendra, 1999b).

Es zeigte sich aber, dass die Alternative Oxidase bei einem erhöhten Pyruvatgehalt mit dem Hauptweg um die Elektronen vom Ubiquinon-Pool konkurrieren kann (Hoefnagel et al., 1995; Ribas-Carbo et al., 1995; Vanlerberghe et al., 1995; Igamberdiev et al., 1997a). In diesem Fall ist für ihre Aktivierung keine Sättigung des Hauptweges nötig.

### 3.3.4 Erzeugung von Reaktivem Sauerstoff (ROS) in den Mitochondrien

Wie die ETC in den Chloroplasten kann auch die mitochondriale Elektronentransportkette Elektronen auf Sauerstoff übertragen und so reaktiven Sauerstoff (ROS) erzeugen. So führt eine zu starke Reduktion des Quinon und eine Hyperpolarisation des Membranpotentials dazu, dass die Reoxidation des Komplex I behindert wird (Casolo et al., 2000). Dies erhöht deutlich die ROS-Produktion im Eisen-Schwefel-Cluster N2 (Genova et al., 2001) oder N1-a (Kushnareva et al., 2002).

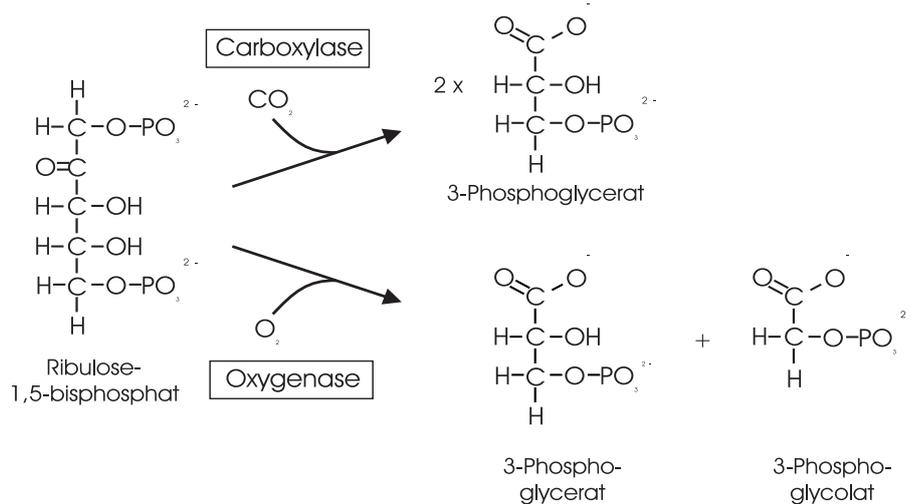
Dabei macht nicht nur die Störung der Reoxidation des Ubiquinol (Kushnareva et al., 2002) Probleme: Einige Autoren (Braidot et al., 1999; Gredilla et al., 2001; Batandier et al., 2004) haben festgestellt, dass das Füttern des Komplex II mit Succinate aus dem TCA-Zyklus zu einer stärkeren ROS-Erzeugung führt als die Anlieferung von NADH zum Komplex I.

Die AOX kann nun den höheren Reduktionsgrad des Quinons verringern, was zu einer Stabilisierung des Redox-Potenzials des Ubiquinon-Pools und einer Verminderung der ROS-Bildung führt (Millenaar und Lambers, 2003). Versorgt man hingegen die Mitochondrien mit Succinat und inhibiert die AOX mit SHAM (siehe Abschnitt 4.3), so kommt es zu einer starken  $H_2O_2$ -Bildung (Popov et al., 1997).

Allerdings kann die ROS-Erzeugung bei der Pathogen-Abwehr auch aus Sicht der Pflanze wünschenswert sein, so dass die AOX herunterreguliert werden könnte (Day et al., 1995).

## 3.4 Photorespiration

Im Abschnitt 3.2.4 wurde die Hauptreaktion des Enzyms RubisCO beschrieben, nämlich die Fixierung von atmosphärischem  $CO_2$ , indem dies an RuBP gebunden wird unter Bildung von zwei 3-Phosphoglycerat. Die RubisCO weist aber auch noch eine Nebenreaktion auf, bei der Sauerstoff an RuBP gebunden wird und nur ein 3-Phosphoglycerat entsteht und ein 2-Phosphoglycolat (siehe Schema in Abb. 3.9). Dabei ist die  $CO_2$ -Konzentration, die für eine 50%ige Sättigung des Enzyms nötig ist, viel niedriger als die von  $O_2$ , aber zusammen mit der viel geringeren  $CO_2$ -Menge in der Luft (350 ppm zu 21%) kommt die RubisCO auf ein Verhältnis von Carboxylierung zu Oxygenierung von 4:1 bis 2:1 (Heldt, 2003).



**Abbildung 3.9:** Der Calvin-Zyklus: Das zentrale Enzym Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Oxygenase katalysiert zwei Reaktionen: die Carboxylierung von RuBP, dies ist die eigentliche  $\text{CO}_2$ -Fixierung, sowie die Oxygenierung als Nebenreaktion (Heldt, 2003).

Da also die Oxygenierung ein häufiges Ereignis ist und die Pflanze nur das 3-Phosphoglycerat weiter im Calvin-Zyklus verarbeiten kann, muss sie das entstehende 2-Phosphoglycolat „recyclen“, um kein RuBP zu verlieren. Dies geschieht im sogenannten „Photorespirations-Weg“ wie er in der Abb. 3.10 gezeigt ist. Dieser erstreckt sich über drei Kompartimente, nämlich Chloroplasten, Peroxisomen und Mitochondrien, und ist mit einem bedeutenden Verbrauch von Redox-Äquivalenten ( $\text{NAD(P)H}$ ) und Energie ( $\text{ATP}$ ) verbunden.

### Reaktionsschritte bei der Photorespiration

Das entstandene 2-Phosphoglycolat wird in Glycolat umgewandelt (Abb. 3.10), welches mittels Translokator in die Peroxisomen gelangt. Dort erfolgt die Umsetzung in Glyoxylat, wobei reaktiver Sauerstoff in Form von  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht, welcher direkt durch das Enzym Catalase in Wasser und Sauerstoff disproportioniert wird. Das Glyoxylat wird zu Glycin umgewandelt und in den Mitochondrien weiter zu Serin, welches wieder in den Peroxisomen zu Hydroxypyruvat und weiter zu Glycerat umgesetzt wird. Letzteres wird wieder in die Chloroplasten transportiert und dort zu dem gewünschten 3-Phosphoglycerat umgesetzt, so dass der Calvin-Zyklus weiterlaufen kann. Der in den Mitochondrien freiwerdende Stickstoff (in Form von  $\text{NH}_4$ ) wird in den Chloroplasten im GOGAT/GS-Zyklus (Noctor und Foyer, 1998) wieder fixiert (siehe Umwandlung von 2-OG in GLU in Abb. 3.11).

### Nutzen der Photorespiration

Über den Nutzen der mit hohem Energieverbrauch einhergehenden Photorespiration für die Pflanze herrscht keine Klarheit. Wenn allerdings bei Wassermangel die Stomata (siehe Abschnitt 12.1) geschlossen sind und damit in kürzerer Zeit das  $\text{CO}_2$  im Blatt verbraucht ist, liefert der Photorespirationsweg eine Möglichkeit, die dann überschüssigen Redox-Äquivalente loszuwerden und eine Schädigung des Photosyntheseapparates zu vermeiden (Krause, 1994).

Bei der Pathogenbekämpfung ist eine Beteiligung der Photorespiration denkbar, da das in den Peroxisomen entstehende  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Kampf eingesetzt werden kann.

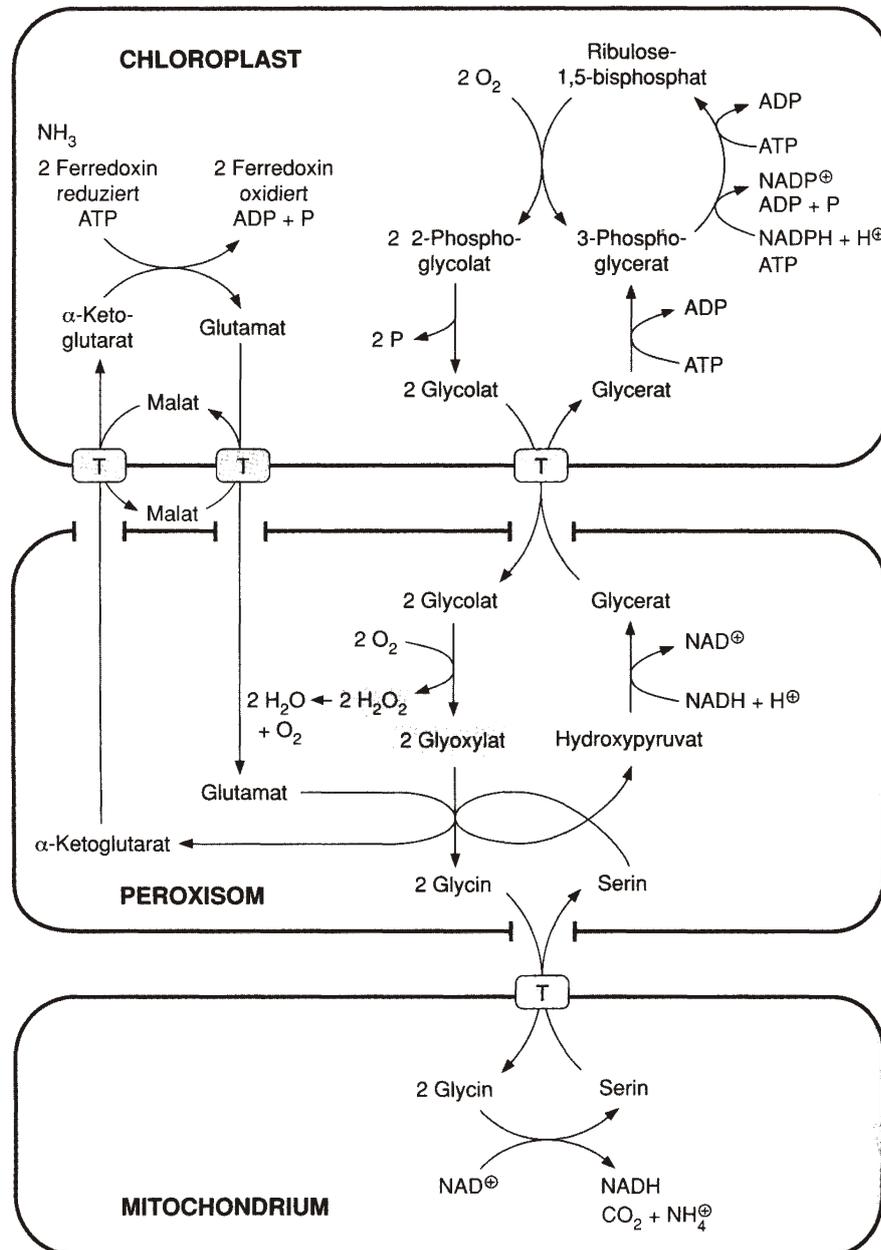


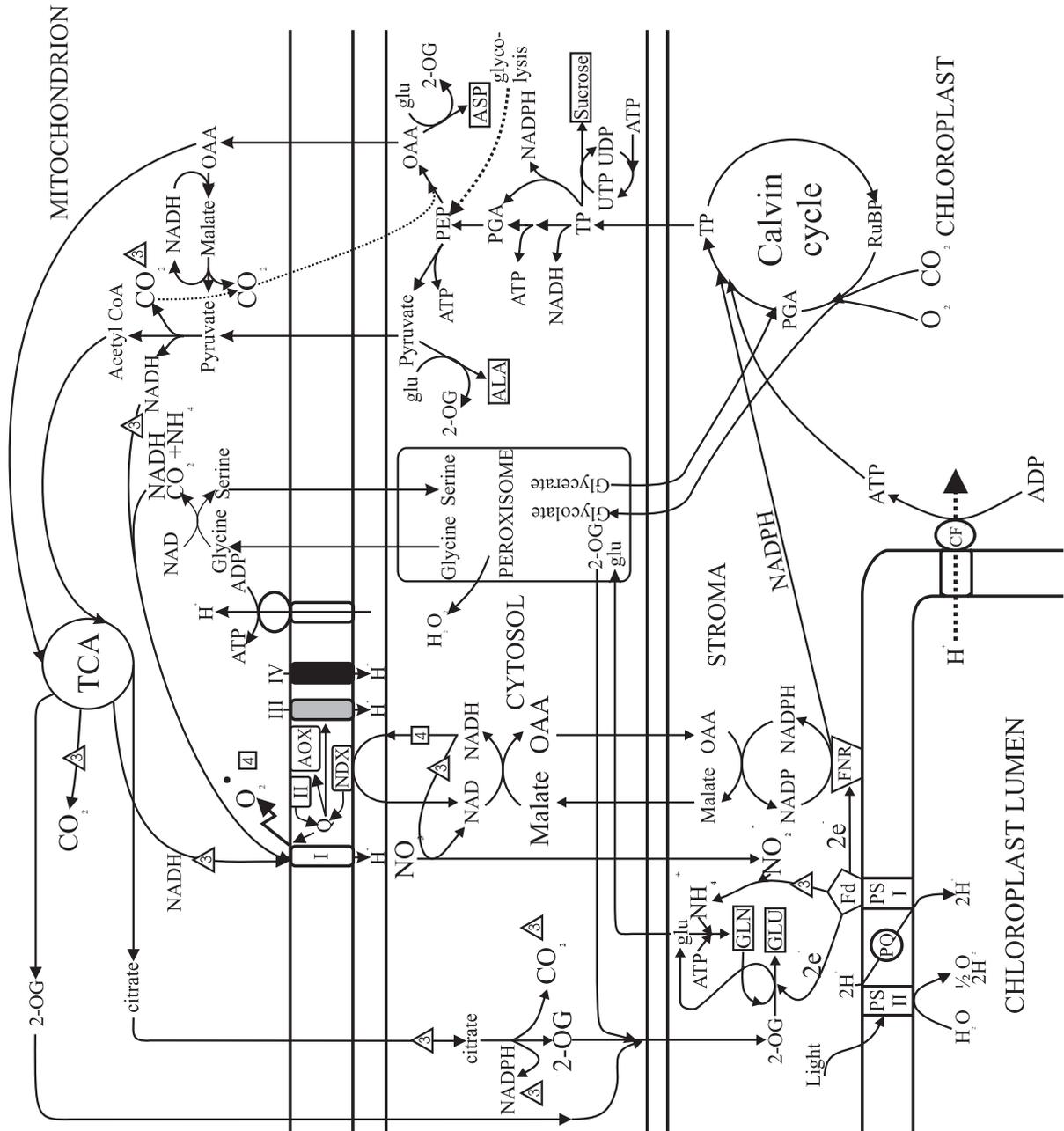
Abbildung 3.10: Schema der Reaktionsschritte der Photorespiration in den drei beteiligten Kompartimenten (Heldt, 2003). Ein Stoffaustausch dazwischen erfolgt mittels Translokatoren („T“). Details siehe Text.

### 3.5 Zusammenfassende Darstellung

In Abbildung 3.11 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 denen auch der Weizen (*Triticum aestivum*) und Giersch (*Aegopodium podagraria*) gehört. Die Bezeichnung kommt daher, dass das erste Produkt der CO<sub>2</sub>-Fixierung 3-Phosphoglycerat ein sogenannter 3-Kohlenstoffkörper ist, das heißt, der Stoff hat drei Kohlenstoff-Atome. Im Gegensatz dazu entsteht bei der Kohlenstofffixierung bei C<sub>4</sub>-Pflanzen Oxalacetat, ein 4-Kohlenstoffkörper. Die C<sub>4</sub>-Pflanzen haben einen Mechanismus, der es ihnen erlaubt, die CO<sub>2</sub>-Konzentration im Chloroplasten stark anzuheben, wodurch sie bei viel geringer geöffneten Stomata und damit weniger Wasserverlust Photosynthese betreiben können. Da diese Pflanzengruppe aber nicht Gegenstand dieser Arbeit ist, wird nicht weiter darauf eingegangen.

Folgende Hauptwege sind in der Abbildung 3.11 erkennbar:

- *CO<sub>2</sub>-Fixierung*: Photosysteme mit Elektronentransportkette in der Thylakoid-Membran des Chloroplasten unten links mit ATP- und NADPH-Erzeugung. Rechts davon die Nutzung der beiden Stoffe zur Fixierung von CO<sub>2</sub> oder O<sub>2</sub> (Photorespiration) im Calvin-Zyklus.
- *Stickstoff-Assimilation*: Im Chloroplasten oberhalb der Thylakoid-Membran: Einbau von Stickstoff in Aminosäuren unter Einsatz von Redox-Äquivalenten und ATP.
- *Redox-Export*: Das Malat-Oxalacetat-Shuttle zum Export ins Cytosol und Verarbeitung in der NDX im Mitochondrium.
- *Weiterverarbeitung des Triosephosphats*: Auf der rechten Seite im Cytosol wird das vom Calvin-Zyklus gelieferte TP weiterverarbeitet in Aminosäuren, in Pyruvate (für die Mitochondrien) oder in Sucrose, welche später in Stärke umgesetzt wird.
- *Photorespirationsweg*: Vom Calvin-Zyklus über die Peroxisomen (Mitte) bis in die Mitochondrien.
- *TCA-Zyklus und ETC*: Energieerzeugung in den Mitochondrien (oben Mitte): Erzeugung von NADH, Lieferung an die ETC mit den Komplexen I-IV, dem Ubiquinonpool, der AOX und der ATPase.
- *ROS-Erzeugung*: Am Komplex I in den Mitochondrien kann bei Überreduktion von „Q“ reaktiver Sauerstoff entstehen in Form von O<sub>2</sub><sup>-</sup>.



**Abbildung 3.11:** Zusammenfassende Darstellung der Stoffwechselprozesse in den Zellkompartimenten Chloroplasten, Mitochondrien, Peroxisomen und Cytosol; nach Guo et al. (2005). Die „4“ im Quadrat und die „3“ im Dreieck beziehen sich auf unterschiedliche Stoffwechselwege bei Pflanzen, die mit Nitrat oder Ammonium gedüngt wurden. Dies ist aber nicht Bestandteil dieser Arbeit, weshalb nicht weiter darauf eingegangen wird.

## Kapitel 4

# Pflanzen und Messsysteme

Dieses Kapitel widmet sich zum einen den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pflanzen und ihrer Aufzucht, sowie den eingesetzten Pathogenen und beschreibt zum anderen verwendete Messverfahren und Messsysteme. Details, insbesondere die genauen Messprotokolle, werden in den späteren Kapiteln bei den zugehörigen Messungen dargestellt. Die besonderen Messaufbauten für die Messungen an den Stomata, die Detektion von reaktivem Sauerstoff, die Zeaxanthin-Bestimmung mittels HPLC und die Messung mit dem Algenspektrometer finden sich in den zugehörigen Kapiteln 12, 14, 16 bzw. 17.

### 4.1 Verwendete Pflanzen

#### 4.1.1 Giersch (*Aegopodium podagraria*)

Parallel zur Anzucht der eigentlichen Versuchspflanzen wurde der Messaufbau an Freilandexemplaren von Giersch getestet, da es hiermit bereits Erfahrungen gab (Hansen et al., 1993).

#### 4.1.2 Weizen (*Triticum aestivum*)

##### Anzucht im Institut für Phytopathologie

Ein Teil des für diese Arbeit verwendeten Weizens wurde unter Leitung von Dr. Schnieder und Prof. Verreet im Institut für Phytopathologie der Kieler Universität angezogen. Dazu wurde die Sorte „Ritmo“ verwendet. Diese hatte sich in Vorversuchen als am anfälligsten für eine Pilzinfektion erwiesen. Die Körner wurden einer Vernalisation für 6 Wochen bei 4°C unterzogen. Dieser Kälteschock ist nötig, damit die Pflanze später auch Ähren mit Körnern ausbildet. Danach wurden die Keimlinge in Einheitserde (Einheitserde Uetersen) verpflanzt und in einem Heraphyten (Heraeus Vötsch HPS2000) 16h Licht mit ca.  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bei 18°C und 8h Dunkelheit bei 14°C ausgesetzt.

Nachdem die Pflanzen im Mittel 2 Monate gewachsen waren, wurden sie ins Messlabor transportiert und dort mit Licht der Stärke von ca.  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Osram Luminlux Eco Warm White und Philips TLD) bei einem Tag-/Nachtrhythmus von 16h/8h bei Raumtemperatur versorgt. Dort verblieben die Pflanzen bis zur Messung, infizierte zur Beobachtung des Infektionserfolges auch länger.

##### Anzucht im eigenen Labor

Parallel zur Anzucht im Institut für Phytopathologie wurde auch in institutseigenen Klimakammern junger Weizen angezogen.

In Anlehnung an die Beschreibung von Krupinska (1992) wurden Weizenkörner in mit Vermiculit gefüllte Pflanztopfe gelegt, bedeckt und befeuchtet. Die Töpfe wurden auf Schalen gestellt, die mit Wasser befüllt waren, und in einer Klimakammer einer Temperatur von 23°C („tagsüber“, Licht:  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 10h) und 20°C („nachts“, 14h) ausgesetzt.

Da auch die infizierten Weizenpflanzen in der Klimakammer aufbewahrt werden mussten, wurde aus Sicherheitsgründen eine „Kammer in der Kammer“ verwendet, um eine Pilzausbreitung über die infizierten Pflanzen hinaus zu verhindern. Diese Kammer bestand aus einem Glasaquarium (70x42x35 cm, siehe Abb. 4.1), welches an der zur Seite gedrehten Öffnung mit einer Kunststoff-Tür verschlossen wurde. In dieses Behältnis wurden die Schalen mit Pflanztöpfen hinein gestellt. Innerhalb dieses Kastens trennte eine Folie den Bereich der gesunden Pflanzen von den infizierten. Zwei runde Löcher (Ø 14 cm), welche mit Filterpapier verschlossen waren, ermöglichten den Luftaustausch, verhinderten aber den Austritt von Pilzsporen. Auf der Seite der gesunden Pflanzen war auch Filterpapier angebracht, damit sich in beiden getrennten Teilen des Kastens aus Gründen der Vergleichbarkeit ähnliche Bedingungen (Luftfeuchte, Gasaustausch usw.) einstellen konnten.

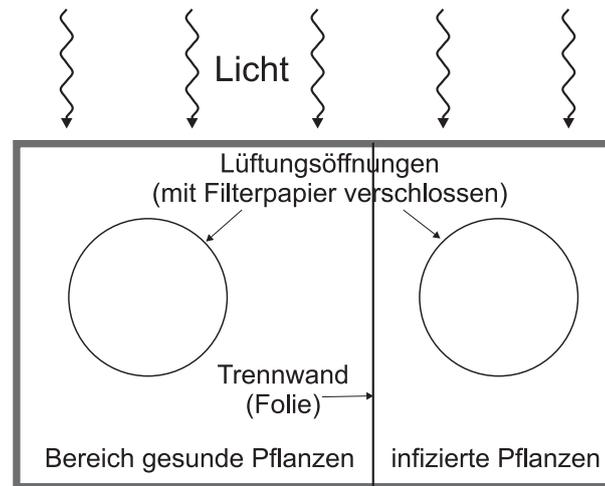


Abbildung 4.1: Vorderansicht des Kastens zur Weizenanzucht in der Klimakammer

## 4.2 Weizenpathogene

Als Pathogene wurden die Pilze *Septoria tritici* und *Septoria nodorum* eingesetzt. *Septoria tritici*, auch *Blattdürre* genannt, befällt ausschließlich Weizenpflanzen. Dieser Pilz tritt besonders in maritimen Klimaregionen auf (Verreet, 1995) bzw. bei nasser Witterung (Shaner und Finney, 1976) und damit nicht nur sehr häufig in den Marschgebieten Norddeutschlands, sondern auch an vielen Orten in der Welt, z. B. Australien (Eyal et al., 1973), Latein-Amerika (De Ackermann et al., 1995) und dem Osten der USA (Shaner und Finney, 1982). Wird ein Weizenfeld befallen, so kann dies bis zu 50 % Ertragseinbußen verursachen (Eyal und Ziv, 1974).

Man unterscheidet zwei verschiedene Stadien dieser Pilze: die *Hauptfruchtform* und die *Nebenfruchtform*. Diese treten unterschiedlich auf, sowohl zeitlich als auch in ihrer Form und Verbreitung. Deshalb ging man eine ganze Zeit davon aus, dass es sich nicht um den selben Pilz in unterschiedlichen Stadien handelt. Darum tragen beide auch unterschiedliche Namen: *Mycosphaerella graminicola* bzw. *Septoria Tritici*. Eriksen und Munk (2003) zeigten, dass es sich hierbei um denselben Pilz in unterschiedlichen Stadien handelt.

- *Mycosphaerella graminicola* ist der *Teleomorph* bzw. die *Hauptfruchtform* oder das sexuelle Stadium. In diesem kann der Pilz die Zeit ohne Bewuchs auf den Feldern überdauern und wird dann bei Beginn der Wachstumsperiode mit Wind und Wasser auf den Feldern verteilt. Dadurch entsteht die Primärfektion des Bestandes mittels Ascosporen, die fast gleichmäßig über das Feld erfolgt.

- *Septoria Tritici* ist der zugehörige *Anamorph* bzw. die *Nebenfruchtform* oder das asexuelle Stadium. Dieses entsteht aus der Primärinfektion und bewirkt die fast epidemische Verbreitung auf dem Feld. Diese erfolgt durch Pycnosporen in Pyknidien (=Fruchtkörper) von einer Blattetage zur nächsten.

Da für die Schädigung der befallenen Pflanzen sowie für die weiteren Infektionen während der Wachstumsperiode und für die Bekämpfung fast ausschließlich die Nebenfruchtform von Interesse ist, wird nur diese im Folgenden betrachtet.

*Septoria nodorum* verhält sich ähnlich wie *Septoria tritici* und wurde wegen der größeren Aggressivität zum Teil bei der Infektion verwendet.



**Abbildung 4.2:** Stück eines Weizenblattes, das von *Septoria tritici* befallen ist. Die hellgelben oder braunen Stellen sind Läsionen, darin die schwarzen Pyknidien (Fruchtkörper).

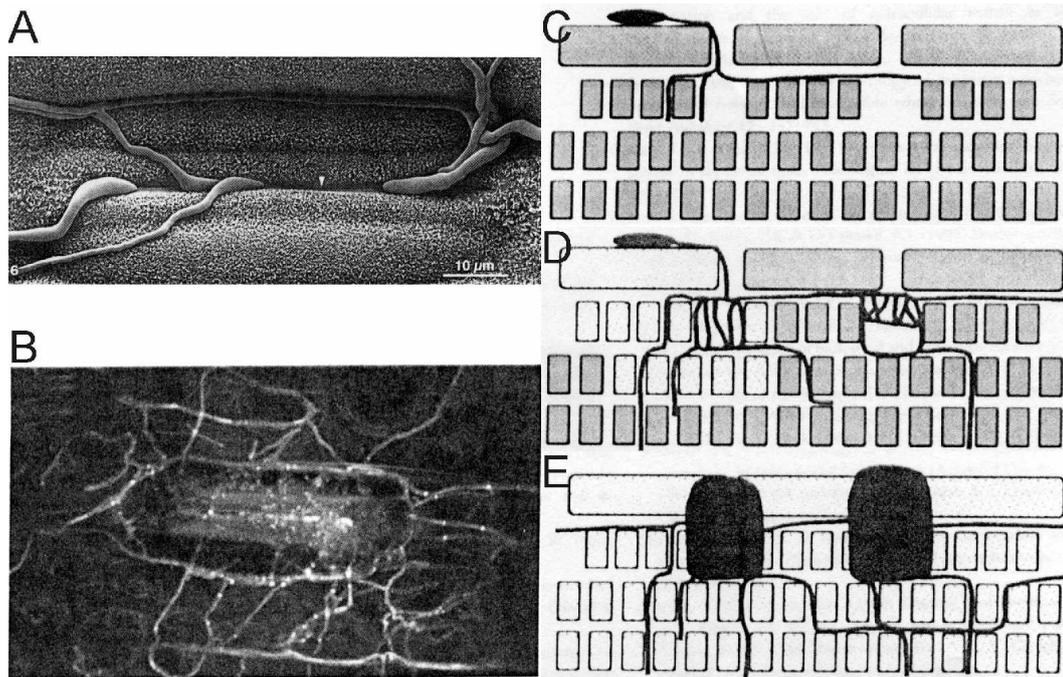
#### 4.2.1 Infektionsverlauf

Gelangt eine Spore auf ein Blatt, so sucht sich ein ausgetriebener Keimschlauch eine Spaltöffnung. Innerhalb der nächsten Tage breitet sich dann der Pilz im Blattgewebe aus (Duncan und Howard, 2000), wie auch in der Abbildung 4.3 gezeigt:

- Innerhalb der ersten 24 h nach Inoculation treten erste Hyphen in den substomatären Räumen auf.
- Bis 2 Tage nach Inoculation breitet sich der Pilz interzellulär in das umgebende Mesophyll-Gewebe aus.
- Bis zum dritten Tag breiten sich die Hyphen auf benachbarte substomatäre Räume aus und schaffen so viele Kolonien.
- In den nächsten Tagen breiten sich die Hyphen immer weiter im Gewebe aus.

Erst nach einer längeren Inkubationszeit von bis zu 30 Tagen, in der sich keine makroskopisch sichtbaren Veränderungen zeigen, werden im Blatt durch das Absterben von Zellen braune Läsionen sichtbar, in denen sich nach und nach schwarze Pyknidien (Fruchtkörper) bilden. Sind diese reif, so öffnen sie sich und geben die Sporen frei. Ein Bild einer Befallsstelle findet sich in der Abbildung 4.2.

Die Sporenverbreitung findet durch Niederschläge statt. Die kinetische Energie der auftreffenden Regentropfen schleudert die Sporen auf die nächste Blattetage. Auch dort ist Feuchtigkeit



**Abbildung 4.3:** Infektion mit *Mycosphaerella graminicola*, dem Teleomorph von *Septoria tritici*: (A) Cryo-SEM-(Scanning Electron Microscopy)-Bild einer Spaltöffnung von Weizen mit mehreren Keimschläuchen. (B) Konfokal-Laser-Scanning-Mikroskop-Aufnahme einer Schließzelle 9 Tage nach Inokulation, mit WGA-Rhodamine angefärbt. (C-E) Ausbreitung des Pilzes in der Pflanze am dritten, siebenten bzw. vierzehnten Tag nach Inokulation. Die großen dunklen Flecken im Bild E sind die Pygnidien. Aus: Duncan und Howard (2000)

nötig, damit die Keimhyphne eine Öffnung des Blattes suchen kann. Die Infektion kann sich innerhalb der Pflanze durch Wachstum alleine nicht über ein erkranktes Blatt hinaus ausbreiten. Fehlt die nötige Feuchtigkeit, so kann kann der Pilz das befallene Blatt nicht verlassen.

Im Weiteren sorgt das sich ausbreitende Mycel des Pilzes dafür, dass immer mehr Teile der Blattes absterben und damit auch die Photosynthese als Energielieferant ausfällt, worunter schließlich die Versorgung der ganzen Pflanze und vor allem die der Frucht leidet. Auf diese Weise kommen die hohen Ernteeinbußen zustande.

#### 4.2.2 Erkennung und Bekämpfung

Wie oben gesagt, ist eine Früherkennung von *Septoria tritici* nur schwer möglich, da die Pflanze in der langen Zeit zwischen Infektion und Auftreten von Läsionen keinerlei äußere Anzeichen zeigt.

Der bisher in der Landwirtschaft verfolgte Ansatz arbeitet mit einer indirekten Erkennung. Wird im Bestand ein Krankheitsausbruch erkannt, so ist es nicht mehr möglich, die Krankheit selbst zu bekämpfen, da die verfügbaren Fungizide maximal 5–7 Tage nach Infektion wirksam sind. Allerdings kann ein Befall der nächsten Blatttagen verhindert werden. Hierzu wird die Witterung beobachtet. Stellt man dabei einen genügend starken Niederschlag und in der Folge eine hinreichend lange Phase der Blattnässe fest, so hat höchstwahrscheinlich ein Infektionsereignis stattgefunden. Nun kann einige Tage später der Einsatz von Fungiziden stattfinden, die dann noch eine Wirkung haben.

Auf diese Weise ist eine relativ sichere Bekämpfung von *Septoria tritici* möglich. Allerdings hat dieses Verfahren zwei entscheidende Nachteile:

- Es kann erst dann eine Bekämpfung der Weiterverbreitung stattfinden, wenn sich bereits auf einigen Blättern Läsionen gezeigt haben, also bereits eine Schädigung vorliegt.

- Der Fungizid-Einsatz erfolgt vorbeugend. Es wird dabei angenommen, dass eine Infektion stattgefunden hat, dies kann aber nicht sicher festgestellt werden. Es wird also vermutlich zuviel Gift gekauft und in die Umwelt gebracht.

Das Ziel ist also in diesem Fall, eine Infektion bereits dann zu erkennen, wenn dies von außen noch nicht möglich ist, und so früh, dass ein wirksamer und sparsamer Fungizid-Einsatz noch erfolgen kann.

### 4.2.3 Infektion der Pflanzen im Labor

#### Anzucht der Pilze

Auch die Bereitstellung der Pilze übernahm das Institut für Phytopathologie. *Septoria tritici* und *Septoria nodorum* wurden in Petri-Schalen auf MYA-Medium (malt yeast agar, 4gr Malz, 4gr Hefe, 4 gr sucrose, 10 g Agar, Zugabe 1 ltr.) angezogen. Die Platten kamen für 12h unter UV-Licht und wurden dann bei 20°C für mindestens sieben Tage dunkel gelagert.

Zur Inokulation der Pflanzen wurde der Pilzrasen auf einer Petrischale mit Wasser bedeckt, und dann wurden mit einem Objektträger-Glas die Sporen abgekratzt. Nach einer Filterung durch eine Mullbinde wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer unter dem Mikroskop die Sporendichte bestimmt. Es wurden so lange Pilze von neuen Platten hinzugefügt, bis sich ein Wert von  $5 \cdot 10^6$ – $10^7$  Sporen/ml eingestellt hatte. Zur Reduzierung der Oberflächenspannung wurden noch einige Tropfen „Tween 20“ (Roth, Karlsruhe) hinzugegeben.

#### Infektionsverfahren

Die Sporensuspension wurde mit einer handelsüblichen Sprühflasche aus kurzer Distanz auf die Blätter gesprüht, bis sich genügend Tropfen auf den Blättern gesammelt hatten.

Um eine erfolgreiche Infektion zu ermöglichen, war eine hohe Luftfeuchtigkeit vonnöten. Bei den jungen, selbst angezogenen Pflanzen war dazu keine weitere Maßnahme nötig, da in der verwendeten Kammer die Feuchte hinreichend hoch war. Die älteren Weizenpflanzen wurden nach dem Besprühen entweder für zwei Tage in eine kleine Box gestellt, oder es wurde eine Plastiktüte für dieselbe Zeit über die Pflanze gezogen.

## 4.3 Stoffwechselgifte

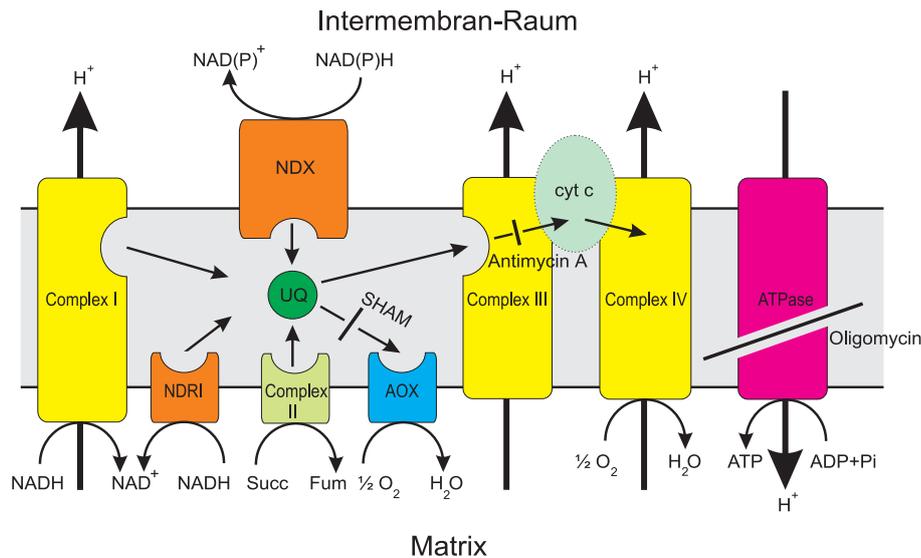
Der Einsatz von Stoffwechsel-Inhibitoren ist eine weit verbreitete Methode zur Identifizierung von Reaktionswegen in lebenden Organismen. So lassen sich gezielt einzelne Wege ausschalten, und man kann die daraus resultierenden Effekte beobachten. Zum Einsatz kamen mehrere Inhibitoren:

- *Glyceraldehyd* hemmt das Enzym RubisCO im Calvin-Zyklus (siehe Abb. 3.4) in den Chloroplasten (Loreto et al., 1994; Wiese et al., 1998).
- *SHAM* (Salicylhydroxamic acid) inhibiert die Alternative Oxidase (AOX) in den Mitochondrien (González-Meler et al., 1996; Igamberdiev et al., 1997a,b), die überschüssige Redox-Äquivalente verbrennt und damit ROS-Bildung in den Mitochondrien verhindert (Maxwell et al., 1999; Purvis, 1997; Guo et al., 2005). Andererseits gibt es auch Hinweise, dass die Chlororespiration durch SHAM gehemmt wird (Feild et al., 1998; Padmavathi und Raghavendra, 2001), aber der Einfluss soll sehr gering sein (Bennoun, 2002; Cournac et al., 2000).
- *Antimycin A* hemmt den Komplex III ebenfalls in den Mitochondrien und legt damit den gesamten Cytochrom-Weg (vom Ubiquinonpool zum Komplex IV) lahm (Igamberdiev et al., 1997b). Dies verhindert aber nicht eine ATP-Produktion, da der Komplex I auch am Aufbau des Protonengradienten beteiligt ist und die AOX als terminale Oxidase immer

noch zur Verfügung steht. Selbst wenn beide Oxidasen inhibiert werden, bleibt noch eine „Rest-Atmung“ (Igamberdiev et al., 1997b). Antimycin A wirkt auch auf einen Teil des zyklischen Transports um PS I in den Chloroplasten (Backhausen et al., 2000; Joët et al., 2001, 2002).

- *Oligomycin* inhibiert die ATPase der Mitochondrien und verhindert damit die ATP-Erzeugung (Igamberdiev et al., 1997b, 1998). Es wirkt zwar auch auf die ATPase in den Chloroplasten, allerdings um ein vielfaches schwächer (Krömer und Heldt, 1991), so dass dies vernachlässigt werden kann.

Die Wirkungsorte der mitochondrialen Inhibitoren zeigt auch die Abbildung 4.4.



**Abbildung 4.4:** Wirkungsorte der mitochondrialen Inhibitoren: SHAM hemmt die Alternative Oxidase (AOX), Antimycin A den Komplex III und damit den gesamten Cytochrom-Weg, Oligomycin hemmt die ATPase.

### Anwendung der Gifte

Falls bei den einzelnen Versuchen nichts anderes angegeben ist, wurden die Inhibitoren wie folgt verwendet (Bezugsquellen im Anhang auf S. 203):

- *Glyceraldehyd*: Lösung mit 10mM in Wasser oder Standard-Medium (SM: 1 mM KCl, 1mM CaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,2)
- *SHAM*: Lösung mit 5 – 20mM in Wasser oder SM
- *Antimycin A*: Lösung mit 10μM in Wasser oder SM
- *Oligomycin*: Lösung mit 10μM in Wasser oder SM

Die Blätter wurden unter Wasser abgeschnitten und für mehrere Stunden oder über Nacht in die Giftlösungen gestellt.

## 4.4 Fluoreszenzmessung

### 4.4.1 Chlorophyll-Fluoreszenz

Es gibt mehrere optische Signale, die genutzt werden, um Informationen über Stoffwechselforgänge zu bekommen:

- *Transmission*: Sie enthält zahlreiche Absorptionssignale, die Aussagen über die Photosynthese liefern, z.B. die Thylakoidspannung (Dau et al., 1991) oder den Redoxzustand des Reaktionszentrums von PS I (Schreiber et al., 1988; Klughammer und Schreiber, 1994).
- *Wärme*: Die Wärmeentwicklung kann photoakustisch gemessen werden und Aufschluss über die thermische Deaktivierung in der Antenne geben (Dau und Hansen, 1990).
- *Reflexion*: Sie beinhaltet das bei 535 nm zu messende Scattering-Signal, das mit dem pH-Gradienten über der Thylakoid-Membran zusammenhängt (Krause und Weis, 1984; Hansen et al., 1993).
- *Fluoreszenz*: Das Fluoreszenz-Signal liefert die größte Vielfalt an Informationen und wird deshalb die zentrale Messgröße in der vorliegenden Arbeit sein. Auf dieses Signal wird im Folgenden noch detaillierter eingegangen.

### Entstehung der Fluoreszenz

Beleuchtet man photosynthetisch aktives Material (grüne Blätter, Algen, verschiedene Bakterien, aber auch isolierte Chloroplasten), so führt dies zur Emission von Fluoreszenzlicht im Bereich von 680 nm.

Das Licht wird von den Antennen der Photosysteme ausgesandt. Wie im Abschnitt 3.2.1 dargestellt, bestehen diese Antennen hauptsächlich aus den Pigmentmolekülen Chl a und Chl b. In der Abbildung 4.5 findet sich auf der linken Seite das Absorptionsspektrum des Chl a (durchgezogene Linie). Man erkennt zwei ausgeprägte Maxima bei 450 nm (blau) und 680 nm (rot). Diese entstehen durch den Übergang vom Grundzustand  $S_0$  zu höheren Singulettzuständen  $S_X$  (in der Abbildung auf der rechten Seite im „Jablonski-Diagramm“ dargestellt). Höhere Anregungszustände können strahlungslos in den  $S_1$  übergehen oder durch einen Energietransfer auf Nachbarmoleküle deaktivieren.

Beim Übergang vom  $S_1$ -Zustand nach  $S_0$  kann Fluoreszenzlicht ausgesandt werden. Geschieht dies nach einer Zeit von mehr als 2 ns, so spricht man von Lumineszenz (delayed fluorescence, manchmal auch Phosphoreszenz genannt), letztere kommt allerdings viel seltener vor. Das Intensitätsverhältnis von Lumineszenz zur Fluoreszenz liegt bei 1:100 bis 1:1000 (Blohm, 1994; Ramm, 1991; Bilger und Schreiber, 1990).

Für ein Exziton (der  $S_1$ -Zustand) gibt es die folgenden Möglichkeiten, wieder in den  $S_0$ -Zustand zu gelangen:

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

Der Prozentsatz des über die Fluoreszenz abgegebenen Lichtes liegt zwischen 3 und 7 % bei intakten, photosynthetisch aktiven Blättern und bei 30 % bei isoliertem Chlorophyll. Dieser Anteil hat eine hohe messtechnische Bedeutung, weil er ein Maß für den physiologischen Zustand und die Photosyntheseaktivität der jeweiligen Probe ist.

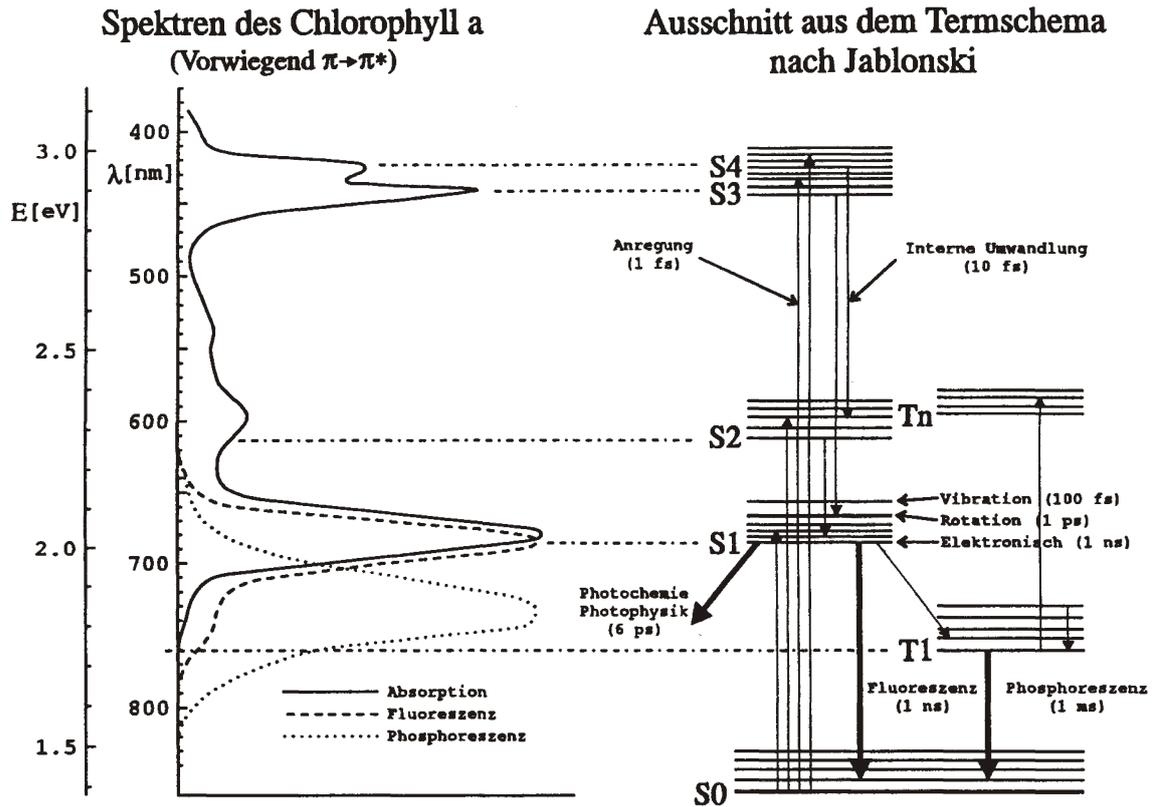


Abbildung 4.5: Darstellung des Absorptions- und Emissionsspektrums von Chl a (links). Die entsprechenden atomaren Zustände sind im Jablonski-Diagramm auf der rechten Seite aufgetragen (Haken und Wolf, 1987).

## Die Photosysteme

Die beiden Photosysteme I und II unterscheiden sich sowohl in ihren Absorptions- als auch ihren Fluoreszenzspektren. PS I absorbiert maximal bei einer Wellenlänge von 700 nm, bei PS II sind es hingegen 680 nm. Dies liegt an der unterschiedlichen Pigmentverteilung in den Systemen. Mit fernrotem Licht ( $\lambda > 700$  nm) kann man diese Tatsache ausnutzen, da hiermit hauptsächlich das Photosystem I angeregt wird und damit dessen Einfluss auf physiologische Prozesse eingeschätzt werden kann.

Die Emission von Fluoreszenzlicht findet bei PS I hauptsächlich bei 735 nm statt, bei PS II sind es 683 nm. Bei Zimmertemperatur kann man davon ausgehen, dass die variable Fluoreszenz ausschließlich vom PS II stammt (Baker und Webber, 1987).

In der Abbildung 4.5 sind deshalb nur die Absorptions- und Fluoreszenzspektren von PS II eingezeichnet.

### 4.4.2 Quenching-Mechanismen

Alle Mechanismen, die, wie im vorigen Abschnitt behandelt, Möglichkeiten zur Deaktivierung von  $S_1$ -Zuständen des Chlorophylls darstellen und zur Verringerung der dazu proportionalen Fluoreszenz führen, bezeichnet man als *Quenching-Mechanismen* (to quench = löschen). Zur Veranschaulichung wird das *Topfmodell* verwendet.

### Das Topfmodell

Für dieses Modell wird ein Topf betrachtet, der mit dem sogenannten *Exzitonensee* (siehe Abbildung 4.6) gefüllt ist, also allen angeregten Zuständen. Die Höhe des Seespiegels ergibt

sich aus dem Gleichgewicht zwischen eingestrahelter Lichtenergie und Exzitonentröfen aus der Antenne heraus. Die Spiegelhöhe ist aber nur als statistisches Mittel zu betrachten, da bei einer Absorptionsrate von 10 bis 100 Photonen pro Sekunde und einer mittleren Lebensdauer der Exzitonon von  $9 \mu\text{s}$  (Rogers und Bates, 1980) die Photosysteme die meiste Zeit über leer sind. Der Topf in der Abbildung stellt die Gesamtheit der Photosysteme II dar.

Die Exzitonenzahl kann über mehrere Wege abgebaut werden: über thermische und photochemische Deaktivierung und über Fluoreszenz-Abstrahlung, wie in Abbildung 4.6 darstellt. Die Ratenkonstanten  $k_t$ ,  $k_p$  und  $k_f$  repräsentieren die zugehörigen Vorgänge.

Man kann nun annehmen, dass die Ratenkonstante  $k_f$  der Fluoreszenz konstant ist, da es sich hierbei um einen rein physikalischen Prozess handelt. Dann spiegelt die Intensität des Fluoreszenzsignals den Pegelstand im Exzitonensee wieder und liefert so eine wichtige Messgröße.

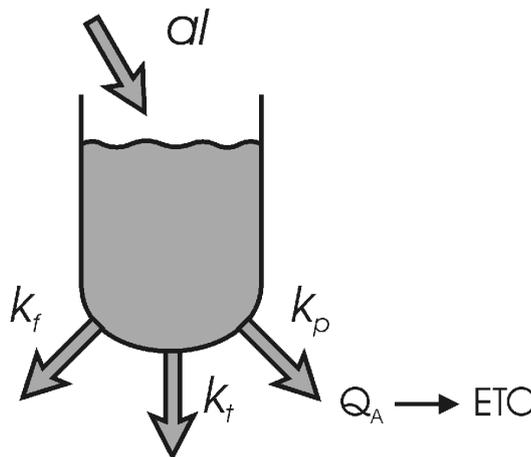
Für den Energietransfer zwischen den einzelnen Photosystemen geht man von einer starken Koppelung der Photosysteme untereinander aus (sog. *Matrix-Modell*). Dann ergibt sich der folgende Zusammenhang zwischen den Größen des Topfmodells (Dau, 1989, 1994):

$$E = \frac{a I}{k_f + k_t + k_p [Q_A]} \quad (4.1)$$

mit	$E$ :	Höhe des Exzitonensees
	$a$ :	mittlerer Absorptionsquerschnitt der Photosysteme II
	$I$ :	Intensität des Anregungslichtes
	$k_f$ :	Ratenkonstante der Fluoreszenz
	$k_t$ :	Ratenkonstante der thermischen Deaktivierung
	$k_p$ :	Ratenkonstante der photochemischen Deaktivierung
	$[Q_A]$ :	Konzentration an nichtreduziertem Quencher $Q_A$

Daraus ergibt sich die Fluoreszenz  $F$  zu:

$$F = k_f E = \frac{a I k_f}{k_f + k_t + k_p [Q_A]} \quad (4.2)$$



**Abbildung 4.6:** Das Topfmodell. Durch eingestrahktes Licht der Intensität  $I$  bildet sich in den PS-II-Antennen ein „Exzitonensee“. Die Deaktivierung der Exzitononenergie kann thermisch ( $k_t$ ), photochemisch ( $k_p$ ) oder über die Abstrahlung von Fluoreszenz ( $k_f$ ) erfolgen.

An Gleichung 4.2 lassen sich verschiedene Quenching-Mechanismen gut erläutern: Eine Verringerung der Fluoreszenz  $F$  kann bei konstantem  $k_f$  und konstanter Lichtintensität  $I$  durch eine Verminderung des Absorptionsquerschnitts  $a$  der Photosysteme oder durch eine Erhöhung der thermischen oder photochemischen Deaktivierung  $k_t$  bzw.  $k_p$  auftreten.

Die ersten beiden Punkte bezeichnet man als nichtphotochemisches Quenching  $q_N$ , die Erhöhung von  $k_p$  als photochemisches Quenching  $q_p$ . Mit Hilfe der nichtphotochemischen Prozesse ist die Pflanze in der Lage, sich vor zu hohen Lichtintensitäten zu schützen. Dabei werden verschiedene Arten unterschieden:

- Das *Energy-Quenching*  $q_E$  wird auch pH-abhängiges Quenching genannt, weil es zusammen mit dem Aufbau des pH-Gradienten über der Thylakoid-Membran auftritt. Es macht sich in einem Anstieg von  $k_t$  im Zeitraum von 5 bis 20 Sekunden bemerkbar. Die genauen Prozesse, die zu dieser thermischen Deaktivierung führen, sind noch nicht vollständig geklärt (Dau und Hansen, 1990; Schreiber und Neubauer, 1990; Schreiber et al., 1991; Ramm und Hansen, 1993; Horton und Ruban, 1993; Horton, 1996).
- Beim *State-Transition-Quenching*  $q_T$  werden die beweglichen LHCs zwischen den Photosystemen II und I umverteilt, um eine bessere photochemische Ausnutzung der Anregungsenergie zu erreichen. Dies äußert sich in einer Verringerung des Absorptionsquerschnitts  $a$  und tritt nach 3 bis 10 Minuten auf (Dau und Hansen, 1988; Dau, 1989; Dau und Canaani, 1990).
- das *Photoinhibitions-Quenching*  $q_I$  wird durch sehr hohe Lichtintensitäten ausgelöst. Dabei werden Einheiten von PS II geschädigt und damit wird die Fluoreszenzausbeute vermindert. Dieser Prozess läuft mit einer Zeitkonstanten von 30 Minuten relativ langsam ab und macht sich ebenfalls in einer Verringerung des Absorptionsquerschnitts  $a$  bemerkbar (Powles und Björkman, 1982; Krause und Laasch, 1987).

### 4.4.3 Fluoreszenzkinetik

Wird ein dunkeladaptiertes Blatt mit Licht mittlerer Intensität bestrahlt, so zeigt das Fluoreszenzsignal einen charakteristischen Verlauf, der in Abbildung 4.7 zu sehen ist. Dieses Phänomen wurde zum ersten Mal von Kautsky und Hirsch (1931) entdeckt und wird häufig als „Kautsky-Induktionskurve“ bezeichnet. Aus dem Kurvenverlauf kann auf einzelne Prozesse geschlossen werden. Die zu den in der Grafik eingezeichneten Nummern gehörenden Prozesse werden im nächsten Abschnitt genauer besprochen.

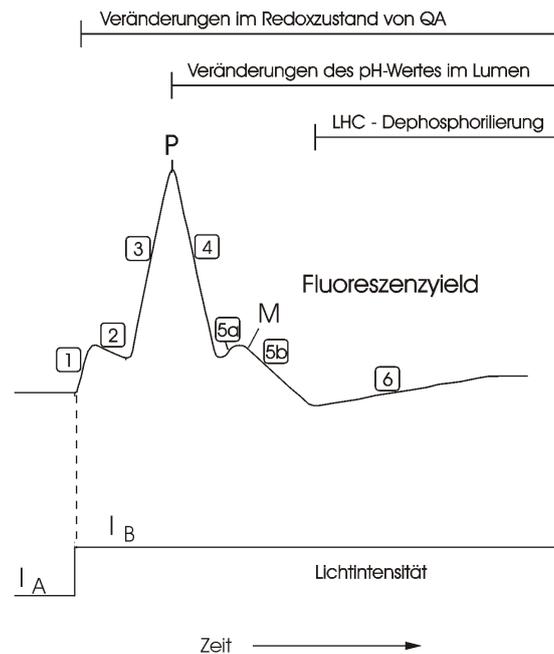
#### Die Zeitkonstanten und ihre Bedeutung

Unter linearisierenden Messbedingungen (Hansen et al., 1991) lässt sich die Fluoreszenzantwort auf einen Lichtsprung aus der Abbildung 4.7 durch die Summe von Exponentialfunktionen nähern:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_i}}\right) \quad (4.3)$$

Jede Zeitkonstante  $\tau_i$  entspricht dabei näherungsweise einem Prozess während der Photosynthese. Die Amplitudenfaktoren  $A_i$  spiegeln die Ausprägung der jeweiligen Prozesse wider. Folgende Prozesse liegen den in der Abbildung 4.7 dargestellten Zeitkonstanten zugrunde:

- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| $\tau_1 < 1 \text{ s}$      | Das Anwachsen der Fluoreszenzausbeute wird hauptsächlich durch die zunehmende Reduktion des Quenchers $Q_A$ verursacht.  |
| $1 < \tau_2 < 10 \text{ s}$ | Das leichte Absinken der Fluoreszenz spiegelt die Redoxzustandsänderung im PQ-Pool wider aufgrund der Saugwirkung von PS I. In dieser Phase wird $Q_A$ verstärkt vom PQ reoxidiert. Damit ist eine Zunahme des Elektronenflusses verbunden, der sich in der Verringerung der Fluoreszenzausbeute äußert. |



**Abbildung 4.7:** Charakteristische Fluoreszenzantwort auf einen Sprung in der Lichtintensität von  $I_A$  auf  $I_B$ . Die eingezeichneten Nummern bezeichnen die zugehörigen Zeitkonstanten; siehe Text (Hansen et al., 1993).

- $2 < \tau_3 < 20 \text{ s}$  Die zunehmende Reduktion der Akzeptoren von PS I bewirkt eine Abnahme der Reoxidation von PQ. Dies führt zu einem Mangel an Akzeptoren für PS II, was einen Anstieg der Fluoreszenz auf den Maximalwert P mit sich bringt (Vanselow, 1993).
- $3 < \tau_4 < 30 \text{ s}$  Der steile Abfall der Fluoreszenz ist zum einen auf verstärktes Energy-Quenching durch den Aufbau des pH-Gradienten über der Thylakoid-Membran zurückzuführen (Hansen et al., 1987, 1993; Dau und Hansen, 1989, 1990). Zum anderen verursacht das mit dem Aufbau des pH-Gradienten zusammenhängende Anlaufen des Calvin-Zyklus und die damit verbundene Sogwirkung auf die ETC auch einen Anstieg des photochemischen Quenchings.
- $10 < \tau_{5a} < 100 \text{ s}$  Diese Zeitkonstante, die mit einer Zunahme der Fluoreszenz auf das Nebenmaximum M einhergeht, hängt mit der lichtinduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in die Chloroplasten (Plieth und Hansen, 1992, 1998; Vanselow et al., 1989) zusammen.
- $50 < \tau_{5b} < 250 \text{ s}$  Der genaue Ursprung dieses Prozesses ist zur Zeit noch nicht bekannt. Es wird ein Zusammenhang mit der verstärkten Umwandlung von ATP zu ADP ermutet (Dau, 1994).
- $200 < \tau_6 < 1000 \text{ s}$  Diese Phase verschwindet nach Zugabe von NaF, das den Austausch der beweglichen LHC zwischen den Photosystemen hemmt. Aus diesem Grunde wird  $\tau_6$  dem Lichtverteilungsregler zugeordnet (Dau und Canaani, 1990, 1992).

Die Sekundenangaben der Zeitkonstanten sind Orientierungswerte. Sie hängen stark von der Art der Pflanze, ihrem jeweiligen physiologischen Zustand sowie der eingestrahelten Lichtintensität ab (Vanselow et al., 1988).

## Yield-Messung

Die Fluoreszenzmessung ist eine sogenannte *Yield-Messung*. Man unterscheidet dabei zwischen zwei Lichtarten:

- das *aktinische Licht* (AL) stellt den Zustand des Blattes ein, das heißt die Größen  $k_f$ ,  $k_t$  und  $k_p$  aus der Abbildung 4.6 durch Veränderung der Redoxzustände der ETC und der Quenching-Mechanismen,
- das *modulierte Messlicht* (ML) detektiert den vom aktinischen Licht eingestellten Zustand.

Bei einer Messung unterscheidet man zwischen dem integralen Fluoreszenzyield

$$Y = \frac{F}{I} \quad (4.4)$$

und dem differentiellen Fluoreszenzyield

$$y = \frac{dF}{dI} \quad (4.5)$$

Die Unterschiede sieht man, wenn man Gleichung 4.2 betrachtet: Dort ist der differentielle Yield dann:

$$y = \frac{dF}{dI} = \frac{k_f}{k_f + k_t + k_p[Q_A]} a \quad (4.6)$$

Die Differentiation wird durch das Messlicht  $dI$  bewirkt und ist damit die Antwort  $dF$  auf eine hochfrequente Änderung  $dI$  des Messlichtes. Hierbei werden  $Q_A$  und  $k_t$  am Arbeitspunkt genommen. Diesen Punkt stellt das aktinische Licht ein, das aus dem Licht der hierfür vorgesehenen Lichtquelle (meist eine Halogenlampe) und dem Mittelwert des Messlichtes besteht.

Der integrale Yield ist das Verhältnis zwischen der Fluoreszenzintensität  $F$  und der des eingestrahlten Lichtes  $I$ . Das Verhältnis  $F/I$  kann zwar auch formal durch den Quotienten aus Gleichung 4.6 beschrieben werden, er ist aber nicht unabhängig von  $I$ , da  $Q_A$  und  $k_t$  sich mit  $I$  ändern.

Nun kann man aber die Frequenz des Messlichtes so hoch wählen, dass sich die Parameter der Gleichung 4.6 während einer Messlichtperiode nicht ändern. Dann ist der mit diesem Messlicht gemessene differentielle Fluoreszenz-Yield mit dem integralen identisch:

$$y = \frac{F}{I} = \frac{dF}{dI} \quad (4.7)$$

Durch das niederfrequente aktinische Licht werden die Parameter der Photosynthese, wie oben beschrieben, verändert, aber auch das Messlicht wirkt aktinisch. Da die Yieldmessung aber nur Prozesse detektiert, die langsamer als die Messlichtperiode ablaufen, wirkt das Messlicht als aktinischer Gleichanteil.

Die Yield-Messung dient der Abtrennung des unerwünschten Gleichanteils des Fluoreszenzsignals, um die interessanten Änderungen entsprechend auflösen zu können. Details und Rechnung hierzu finden sich bei Hammes (2000).

### 4.4.4 Methoden der Fluoreszenzmessung

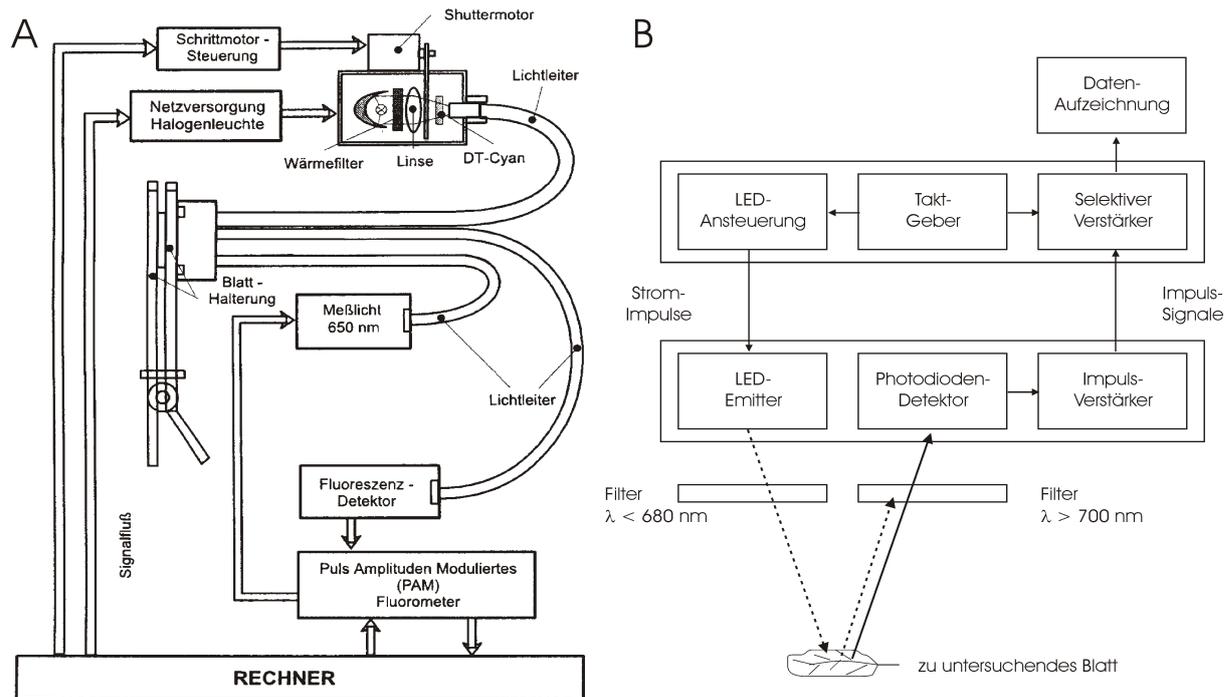
#### Puls-Amplituden-Moduliertes Fluorometer (PAM)

Das Puls-Amplituden-Modulierte Fluorometer (*PAM*) wird von der Firma Walz gebaut und geht auf eine Entwicklung von Schreiber et al. (1986) zurück. Es hat sich inzwischen zu einem internationalen Standardgerät entwickelt.

Eine Prinzip-Skizze des Messaufbaus zeigt Abbildung 4.8. Dieses Gerät benutzt für die Messung der Fluoreszenz des Chlorophylls getrenntes aktinisches Licht und Messlicht. Das gepulste

Messlicht kommt über einen Lichtleiter aus einer LED auf das Blatt, und das zurückgestrahlte Licht wird mit einer Photodiode aufgefangen. Ein Korrelator trennt dann daraus das *Yield*-Signal ab (siehe Abschnitt 4.4.3).

Das rote Anregungslicht, das vom PAM gesteuerte LEDs erzeugen, wird über einen Lichtleiter zum Blatt geführt. Ebenso wird mit dem Licht einer Halogenlampe verfahren (der Shutter dient zum schnelleren Hoch- und Herunterfahren der Lampe), das je nach Stärke als sättigender Blitz oder als aktinisches Licht wirkt. Dieses durchläuft vorher noch ein Wärmefilter. Die vom Blatt zurückgestrahlte Fluoreszenz wird wieder mit einem Lichtleiter zum Detektor geleitet, dessen Signal das PAM empfängt. Ein angeschlossener Rechner steuert das aktinische Licht und nimmt die Messdaten vom PAM auf.



**Abbildung 4.8:** Prinzip des PAM: A: Aufbau einer PAM-Messung: Über einen Lichtleiter wird das Anregungslicht von LEDs und das Licht von einer Halogenlampe zum Blatt geführt. Das Detektorsignal wird dann wieder an das PAM übergeben. Ein Rechner steuert den Ablauf und nimmt die Messwerte auf.

B: Schematischer Aufbau des PAM: Rote Messlichtimpulse werden von LEDs ausgesandt. Das Blatt sendet Fluoreszenzlicht zurück. Dieses, aber nicht das Messlicht, wird vom zweiten Filter zum Detektor durchgelassen. Der selektive Verstärker macht daraus das Signal.

Das PAM hält die Messlichtintensität konstant und misst mit Hilfe der Fluoreszenz die Höhe des Exzitonenseespiegels (siehe 4.4.2: „Das Topfmodell“).

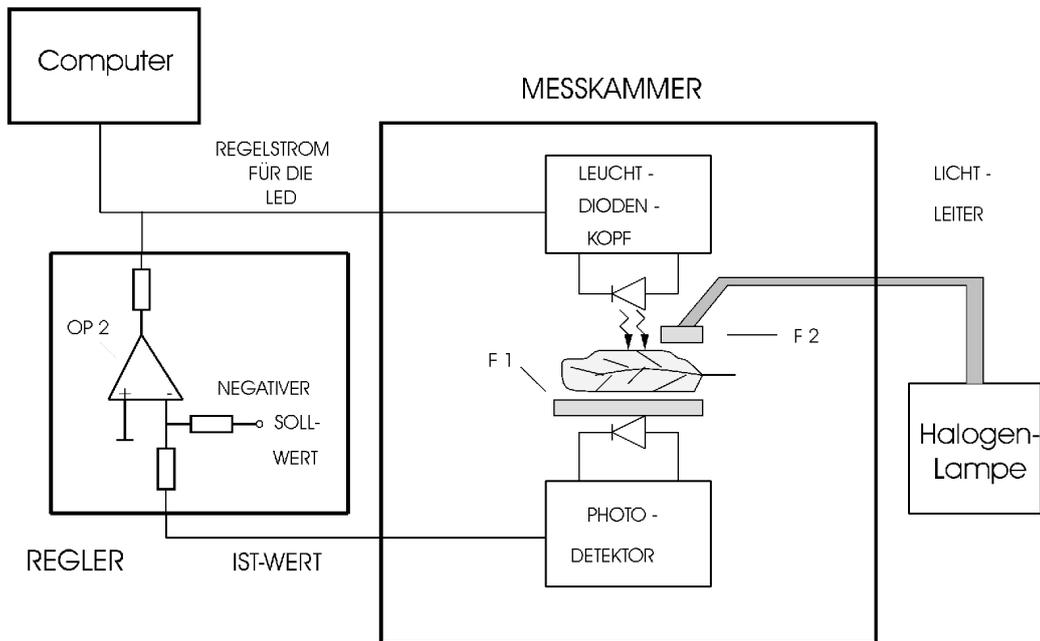
### Fluorescence-Clamp-Maschine (FC)

Der Ansatz bei dieser Maschine ist ein anderer (Schinner et al., 2000; Schinner, 2001): Im Gegensatz zum PAM wird hier die Messlichtintensität so geregelt, dass der Fluoreszenz-Yield konstant bleibt. Dadurch wird nicht die „Seehöhe“ gemessen, sondern über den Photonfluss des Messlichtes der Fluss aus dem „Exzitonensee“.

Eine Übersicht über den Aufbau der FC-Maschine gibt Abbildung 4.9. In einer Messkammer befinden sich wieder Messlicht-LEDs und ein Photodetektor. Wie beim PAM wird auch hier über einen Lichtleiter Halogenlicht zugeführt. Ein Regler sorgt dafür, dass das vom Photodetektor gemessene Fluoreszenz-Signal des Blattes einem festen Sollwert entspricht, indem die

Intensität der Messlicht-LEDs entsprechend eingestellt wird. Das vom Computer aufgezeichnete Messsignal ist in diesem Falle der Leuchtdiodenstrom.

Ein Vergleich der Charakteristika von FC-Maschine und PAM findet sich bei Schinner et al. (2000).



**Abbildung 4.9:** *Prinzip der FC-Maschine: Ein Regler stellt die LEDs so ein, dass das vom Photodetektor gemessene Signal konstant ist. Die Halogenlampe dient als aktinisches Licht. Der LED-Strom ist das zu messende Signal und wird aufgezeichnet.  $F_1$ ,  $F_2$  sind Filter.*

### Sättigungsblitz-Methode nach Schreiber

Bei der Messung von Fluoreszenz ist es üblich, jeweils zwei besondere Zustände der Photosysteme zu bestimmen, welche sich nach längerer Dunkeladaption einstellen: die Werte der Fluoreszenz bei vollständig oxidiertem bzw. reduziertem Quencher  $Q_A$  (Abbildung 3.2). Diese werden mit  $F_0$  (minimale Fluoreszenz) bzw.  $F_M$  (maximale Fluoreszenz bei sättigendem Licht) bezeichnet. Im helladaptierten Zustand heißen die entsprechenden Größen  $F'_0$  bzw.  $F'_M$ . Hat man diese Werte bestimmt, so kann man daraus das photochemische und nichtphotochemische Quenching berechnen.

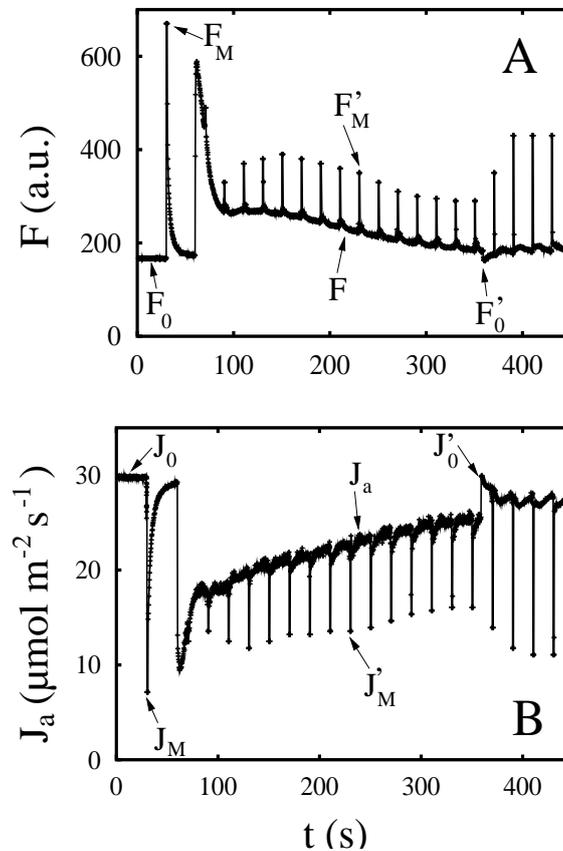
Für die FC-Maschine gilt dies im Prinzip auch, nur dass hier die gemessene Größe nicht die Fluoreszenz, sondern der Exzitonenfluss ist. Deshalb bezeichnet man die Größen an den ausgezeichneten Messpunkten auch mit  $J_0$  bzw.  $J_M$ . Die Indizes bezeichnen dabei wieder den Zustand von  $Q_A$ , aber die Werte drehen sich um ( $J_0$ : Maximaler Fluss im Gegensatz zu  $F_0$ : minimale Fluoreszenz), da zwischen den Größen der PAM- und FC-Messungen ein reziproker Zusammenhang besteht (Schinner et al., 2000):

$$\begin{aligned} \text{maximale Fluoreszenz } F_M &\leftrightarrow \text{minimaler Exzitonenfluss } J_M \\ \text{minimale Fluoreszenz } F_0 &\leftrightarrow \text{maximaler Exzitonenfluss } J_0 \end{aligned}$$

Als standardisierte Messmethode für diese Größen gilt die sogenannte Sättigungsblitzmethode nach Schreiber et al. (1986), die mit dem PAM-Gerät oder der FC-Maschine durchgeführt wird.

Für die Messungen mit beiden Geräten findet ein standardisiertes Lichtprotokoll Verwendung. Eine solche Messung zeigt Abbildung 4.10. Es wird hierbei zwischen zwei Lichtern, dem

Messlicht und dem aktinischen Licht, unterschieden. Das aktinische Licht stellt den Zustand des photosynthetischen Apparates ein (wie bereits in Abschnitt 4.4.3 beschrieben), das Messlicht soll diesen Zustand messen.



**Abbildung 4.10:** Vergleich der Messkurven aus dem Sättigungsblitz-Protokoll (A) mit der PAM und (B) mit dem FC-Prinzip. Verwendetes Lichtprotokoll: in den ersten 60 s nur Messlicht, dann Einschalten des aktinischen Lichtes (markiert mit einem Pfeil nach oben) mit  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bis 360 s (Pfeil nach unten). Dazwischen sättigende Blitze mit ca.  $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Details des Kurvenverlaufs im Text. Aus Schinner et al. (2000).

Den Ablauf der Messung mit PAM und FC-Maschine aus der Abb. 4.10 beschreibt der folgende Abschnitt. Das Messprotokoll wird genauso bei beiden Geräten verwendet.

1. Zur Messung der Grundfluoreszenz  $F_0$  bzw. des Grundflusses  $J_0$  muss das Blatt vorher dunkeladaptiert worden sein. Deshalb darf das Messlicht keine zu große Intensität besitzen. In diesem Fall sind alle Reaktionszentren von PS II geöffnet, das heißt,  $Q_A$  ist vollständig oxidiert, was  $Q_A = 1$  in Gleichung 4.2 entspricht. Aus diesem Grund kann eine maximale Anzahl von Elektronen in die ETC fließen, die Fluoreszenz ist minimal. Deshalb tritt maximales photochemisches Quenching auf ( $q_P = 1$ ;  $q_N = 0$ ), wobei hier  $q_N$  die thermische Deaktivierung ist, die über dem immer vorhandenen minimalen  $k_t$  liegt.
2. Durch einen sättigenden Blitz (in der Abb. 4.10 die Peaks nach unten bzw. oben) von 0,5 s bis 2 s Dauer und mit einer Intensität von ca.  $1000 \text{ W/m}^2$  wird  $Q_A$  vollständig reduziert. Das entspricht  $Q_A = 0$  in Gleichung 4.2 und äußert sich bei einem dunkeladaptierten Blatt in einer maximalen Fluoreszenzantwort. Da der Akzeptor  $Q_A$  völlig reduziert ist, kann er bei zusätzlichem Messlicht keine Elektronen mehr aufnehmen. Es tritt deshalb weder photochemisches noch nichtphotochemisches Quenching auf ( $q_P = 0$ ;  $q_N = 0$ ). Für die FC-Messung gilt analog, dass es keinen Elektronenfluss mehr in die ETC gibt und

damit nur noch thermischer Fluss gemessen wird. Die Länge des Blitzpeaks in der Abb. 4.10 gibt dann die Größe des Elektronenflusses an.

3. Um die Kautsky-Induktionskurve (siehe Abschnitt 4.4.3) zu erhalten, wird aktinisches Licht mittlerer Intensität eingeschaltet. Die Fluoreszenz zeigt einen schnellen Anstieg, dem ein langsamer Abfall auf einen Gleichgewichtszustand  $F$  folgt mit eventuell mehreren Nebenmaxima. Der Exzitonfluss verhält sich invers dazu.
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 ( $q_P = 0$ ;  $0 < q_N < 1$ ); bzw. es wird der minimale Elektronenfluss  $J'_M$  gemessen, der durch die steigende thermische Deaktivierung vergrößert ist.
5. Nach Ausschalten des aktinischen Lichtes wird die Grundfluoreszenz  $F'_0$  im helladaptierten Zustand erreicht.  $F'_0$  kann wegen des inzwischen angewachsenen nichtphotochemischen Quenchings tiefer als  $F_0$  liegen ( $q_P = 1$ ;  $0 < q_N < 1$ ). Für FC-Messungen ist dies  $J'_0$ , und hier ist die Thermik höher als im dunkeladaptierten Zustand.

Aus den mit der PAM gemessenen Größen  $F$ ,  $F_0$ ,  $F'_0$ ,  $F_M$ ,  $F'_M$  lassen sich die Quenching-Parameter wie folgt berechnen (Schreiber et al., 1986; van Kooten und Snel, 1990):

$$\text{Photochemisches Quenching: } q_P = \frac{F'_M - F}{F'_M - F'_0} \quad (4.8)$$

$$\text{Nichtphotochemisches Quenching: } q_N = 1 - \frac{F'_M - F_0}{F_M - F_0} \quad (4.9)$$

Die Trennung der beiden Quenching-Arten ist allerdings nicht sauber, sondern wird nur mit dem FC-Prinzip erreicht: Die Länge des Blitzpeaks liefert den Anteil des Elektronenflusses in die ETC, und der Abstand des unteren Endes des Peaks zu Null ist die thermische Deaktivierung, welche dem nichtphotochemischen Quenching zugeordnet werden kann. Man kann zwar bei einer FC-Messung wegen des konstant gehaltenen Fluoreszenz-Wertes nicht vom „Löschen“ der Fluoreszenz sprechen, aber die zugrunde liegenden Mechanismen sind die selben.

Das  $F_M$ - $F_0$ -Verhältnis liefert Aussagen über den physiologischen Zustand des Blattes, bei einem gesunden ist es ein Wert von 4–5, ein krankes Blatt hat meist niedrigere Werte (2–4).

## 4.5 Fluoreszenz- und Gasflussmessaufbau

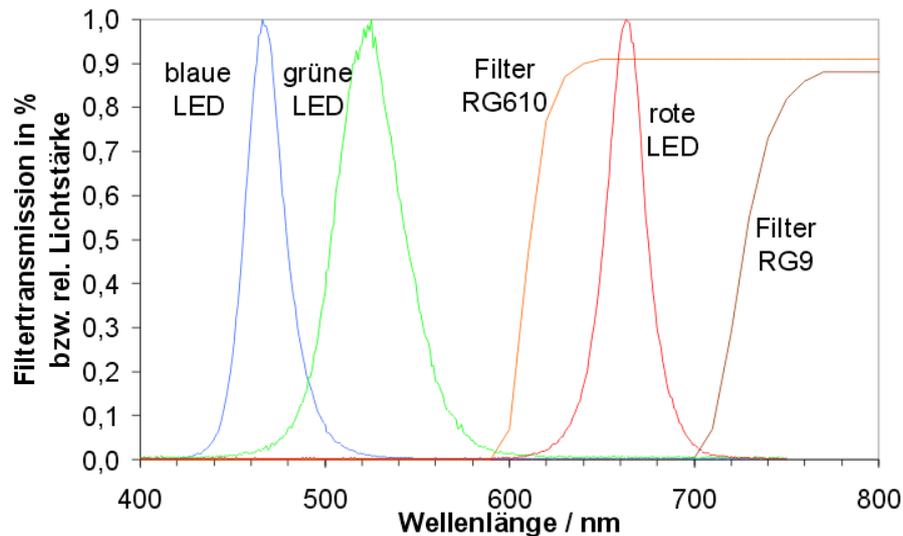
Die Fluoreszenz- und Gasflussmessungen fanden ausschließlich mit der FC-Maschine statt (Abschnitt 4.4.4), da diese, wie in Schinner (2001) beschrieben, besonders bei hohen Flüssen (Thermische Deaktivierung oder ETC) eine größere Empfindlichkeit als die PAM hat (siehe auch Horton, 1996).

Es wurden zwei verschiedene Messplätze verwendet: ein FC-Messplatz, der nur Fluoreszenzmessungen ermöglicht, und ein Gaswechsel-Messplatz, der neben einer FC-Maschine und einigen anderen Signalen auch eine Möglichkeit zur Änderung von Gaskonzentrationen hat. Beide werden im Folgenden beschrieben.

### 4.5.1 Messaufbau FC-Platz

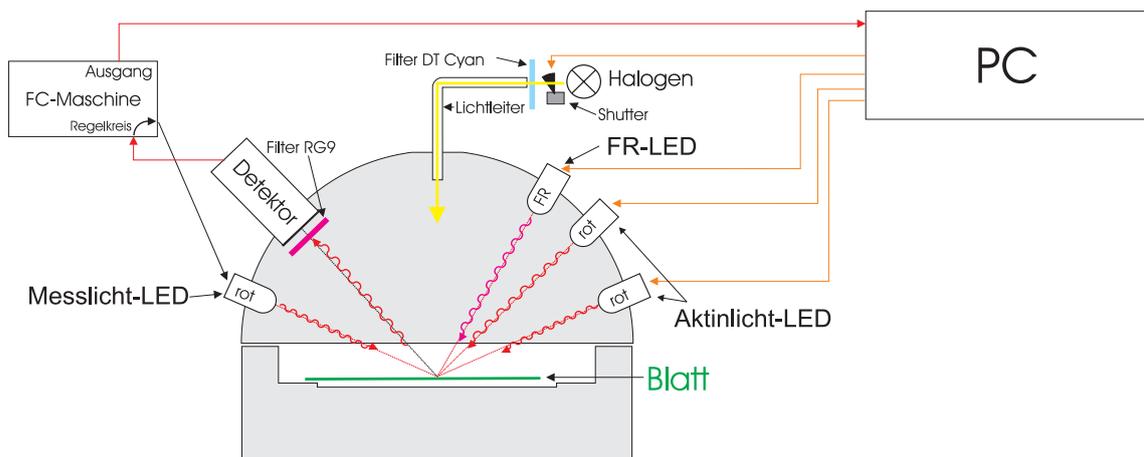
Der Aufbau des FC-Messplatzes war größtenteils derselbe, der auch in der Arbeit von Schinner (2001) verwendet wurde: 18 Rote Leuchtdioden (Oshino, 660 nm, Spektrum in Abbildung 4.11) saßen in einer halbkugelförmigen Kuppel (siehe Abb. 4.12) und lieferten das aktinische Licht (bis max.  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), weitere drei LEDs desselben Typs waren für das von der FC-Maschine geregelte Messlicht zuständig. Zwei weitere Leuchtdioden (Walz) erzeugten fernrotes

Licht ( $\lambda > 700 \text{ nm}$ ). Eine Halogenlampe (Osram, HLX 64653, 24V, 250W) mit nachgeschaltetem Shutter und Wärmefilter (DT Cyan, Walz) erzeugte die sättigenden Blitze. Ein Detektor erfasste die vom Blatt zurückgestrahlte Fluoreszenz, wobei ein RG9-Filter (Schott) den Anregungsanteil des Lichtes abtrennte.



**Abbildung 4.11:** Spektren der verwendeten LEDs für die Fluoreszenz-, 505- und 535-nm-Messungen und Filter.

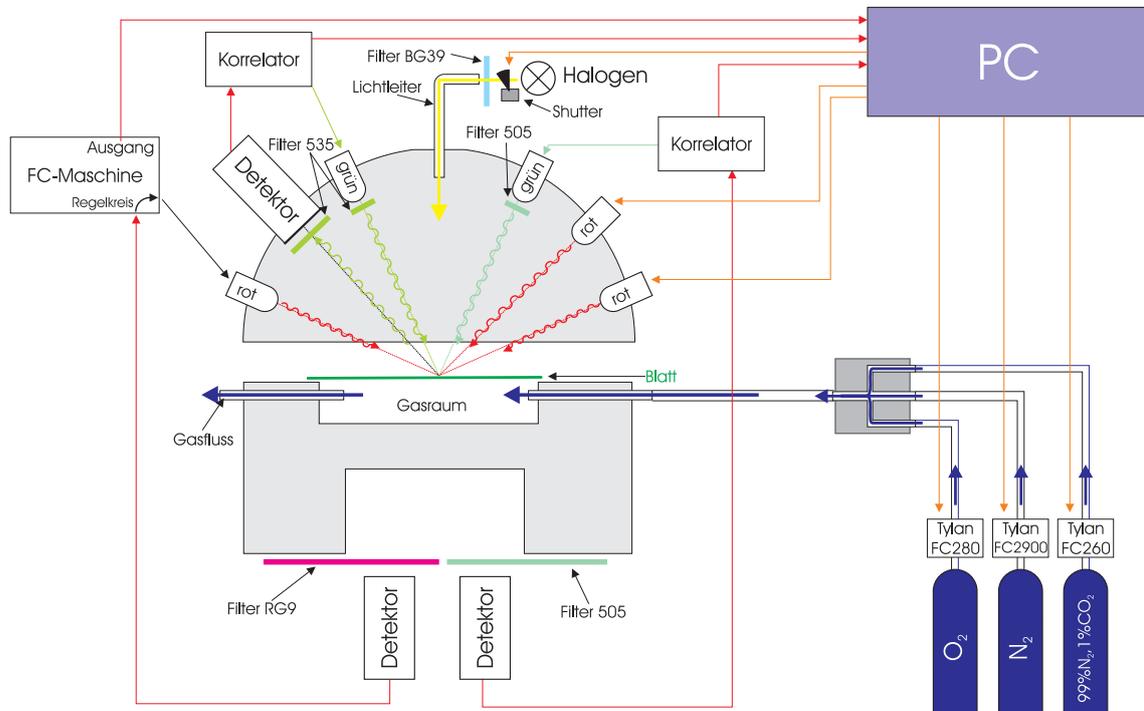
Die Ansteuerung der verschiedenen Lichter (aktinisch, Fernrot, Blitze) und des Shutters wie auch die Aufnahme der Messdaten übernahm ein handelsüblicher PC (Pentium 133MHz, mit Wandlerkarte PCI 6024E, National Instruments, München) mit einem selbstgeschriebenen Programm unter LabVIEW (National Instruments), welches die flexible Verwendung beliebiger Lichtprogramme (und Gasprogramme, s.u.) ermöglichte. Eine Beschreibung findet sich weiter unten im Abschnitt 4.5.3.



**Abbildung 4.12:** Schematischer Messaufbau für die FC-Messungen: In der Kuppel sitzen rote LEDs, die das aktinische Licht und das geregelte Messlicht liefern; das Licht für die sättigenden Blitze erzeugt eine Halogenlampe und kommt über einen Lichtleiter von oben. In der Messkuppel sitzen zusätzlich zwei LEDs für fernrotes Licht. Der Detektor erfasst durch ein RG9-Filter die vom Blatt zurückgestrahlte Fluoreszenz.

### 4.5.2 Messaufbau Gasfluss-Platz

Der Gasfluss-Aufbau ermöglichte die gleichzeitige Messung sowohl des FC-Signales als auch des Scatterings bei 535 nm und der Absorption bei 505 nm oder 820 nm. Gleichzeitig war eine Bepflügelung mit verschiedenen Gaskonzentrationen möglich. Abbildung 4.13 zeigt den Aufbau der Anlage. Auch hier nahm eine Kuppel die LEDs für die verschiedenen Lichtquellen auf (wie unten beschrieben) sowie einen Detektor.



**Abbildung 4.13:** Messaufbau für FC-Messungen der Chlorophyll-Fluoreszenz und für parallele Messungen von Scattering bei 535 nm und Zeaxanthin bei 505 nm bei verschiedenen Gaskonzentrationen. Beschreibung siehe Text.

### FC-Maschine

Im Gegensatz zum anderen FC-Messplatz (Abb. 4.12) wurde in dieser Version das FC-Signal im Durchlichtbetrieb erfasst, das heißt, die Messlicht-LEDs befanden sich genauso auf der Oberseite in der Kuppel wie auch in der Abbildung 4.13 ersichtlich (rote LED auf der linken Seite). Der Detektor hingegen saß auf der anderen Seite des Blattes hinter einem RG9-Filter, das das Anregungslicht abtrennte. Diese Konfiguration verursacht größere Probleme, da im „Durchlicht“ eher die Gefahr besteht, dass das Filter an seiner Sperrkante zuviel Licht auf den Detektor gelangen lässt. Doch durch diese Anordnung wurde weniger Platz in der Kuppel verschwendet, und er konnte für weitere LEDs benutzt werden. Der sonstige Aufbau ist nahezu identisch: rote LEDs für das aktinische Licht, die sättigenden Blitze werden von einer Halogenlampe mit Shutter erzeugt, von einem BG39 (Schott) gefiltert und über einen Lichtleiter (Schölly, Denzlingen) von oben durch die Kuppel auf das Blatt geführt.

### Scattering bei 535 nm

Die Lichtstreuung des Blattes bei 535 nm ist ein Maß für die Thylakoid-Energetisierung (Ruban et al., 1993; Vanselow et al., 1988, 1989) und damit für den pH-Wert des Lumens und nicht etwa für den pH-Gradienten über der Thylakoid-Membran (Briantais et al., 1979), wie vielfach be-

hauptet wird. Da aber der stomatäre pH-Wert nahezu konstant ist, spielt diese Unterscheidung kaum eine Rolle.

Eine grüne LED (NSPG500S, Nichia Chemical, Nürnberg) erzeugt Licht mit dem in Abb. 4.11 gezeigten Spektrum. Ein schmalbandiges Filter (DAL 535, Schott) lässt nur den Bereich um 535 nm passieren. Die LED und das Filter befinden sich in einer kleinen Metallhülse, die in die Messkuppel hineinragt (in der Abbildung 4.13 der Übersicht halber nicht eingezeichnet). Die Detektion des Streulichtes erfolgt unter einem kleinen Winkel, sonst fällt zuviel reflektiertes Licht ein, ebenfalls durch ein 535-er Filter (Bandpass-Interferenzfilter DAD8 536,7 nm, HWB 7,72 nm, Schott), das Störungen u.a. durch die 505-nm-Strecke verhindern soll.

Da die Schmalbandigkeit des Filters nicht gut genug ist und die beiden Messstrecken bei 505 und 535 nm sehr spektral nahe beieinander liegen, wurde die grüne 535-nm-LED mit einem Rechteck-Signal mit einer Frequenz von 10 kHz angesteuert und die 505-nm-LED mit 11 kHz. Ein Korrelator (Lock-In Amplifier 126, Princeton Applied Research) trennte aus dem Detektorsignal den zugehörigen Anteil mit der passenden Frequenz ab und leitete das Signal dem Rechner zu.

### Absorption bei 505 nm

Die Absorption des Blattes bei 505 nm hängt mit der Umwandlung von Violaxanthin in Zeaxanthin (siehe Abschnitt 3.2.6) im Xanthophyll-Zyklus zusammen (Yamamoto und Kamite, 1972; Bilger et al., 1989; Bendixen et al., 2001). Mit der Bildung von Violaxanthin nimmt die Absorption bei 505 nm ab (Pfundel und Bilger, 1994).

Eine entsprechende Messstrecke findet sich in dem Aufbau in der Abbildung 4.13. Ebenfalls eine grüne LED (NSPG500S, Nichia) wie bei der 535-er Strecke (blaugrüne LEDs waren zur Zeit des Aufbaus noch nicht lieferbar) liefert durch ein schmalbandiges Filter (Bandpass-Interferenzfilter DAD8 505,8 nm, HWB 10,76 nm, Schott) das Licht, welches das Blatt passiert und von einem Detektor mit vorgeseztem 505-nm-Filter (DAL 505, Schott) registriert wird. Auch diese Lichtstrecke wird getaktet (11 kHz) und über einen digitalen Korrelator (SR830 DSP Lock-In Amplifier, Stanford Research) betrieben.

Trotz des Aufwandes mit den Trennfiltern und dem Korrelator bleibt das Problem, dass das Zeaxanthin-Signal und das Scattering sich spektral überlappen, weil die Pigmente so breitbandig sind (Bilger et al., 1989). Deshalb ist eine Trennung nur durch eine Betrachtung des zeitlichen Verlaufes möglich: Der Aufbau der Thylakoid-Energetisierung nach Einschalten des aktinischen Lichtes findet wesentlich schneller statt (Zeitbereich 5–20 s) und geht nach dem Ausschalten auch wieder zurück, während die Zeaxanthin-Bildung mehr Zeit braucht und sich nur sehr langsam wieder zurückbildet.

### Gaswechsellanlage

Die in der Abbildung 4.13 auf der rechten Seite eingezeichnete Gaswechsellanlage ermöglicht es, das Blatt in der Messkammer nicht nur mit Gaskonzentrationen wie in der normalen Umgebungsluft zu versorgen, sondern auch Messungen unter wenig CO<sub>2</sub> oder O<sub>2</sub> zu machen.

In drei Druckgasflaschen befand sich Stickstoff, Sauerstoff bzw. ein Gemisch aus 99% Stickstoff und 1% CO<sub>2</sub>. Die Gasflüsse wurden über drei Gasflussregler (N<sub>2</sub>: FC2900, max. 2l/min; O<sub>2</sub>: FC280SA, max. 20ml/min; CO<sub>2</sub>: FC260, max. 10ml/min; Tylan) gesteuert, wobei der N<sub>2</sub>-Fluss in der Regel auf 200ml/min eingestellt war und die anderen Gase entsprechend in der in der Grafik eingezeichneten Kammer dazugemischt wurden. CO<sub>2</sub> wurde nicht in reiner Form verwendet, weil sonst die nötigen Gasflüsse für die Flussregler zu klein gewesen wären.

Ein Kontrollgerät (Brüning, 1990) erlaubte eine Einstellung und Kontrolle der Flussraten. Für die automatisch ablaufenden Messungen wurden die Sollwerte für den O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Fluss vom Steuerrechner in Form zweier Spannungen vorgegeben, der N<sub>2</sub>-Fluss blieb in allen Fällen (bis auf die Messungen zur Windabhängigkeit im Kapitel 13) konstant eingestellt.

## Steuerung und Messaufname

Die Aufnahme der Messwerte der FC-Maschine (Fluoreszenz) und der Korrelatoren für die Messung des Scatterings und der Absorption bei 505 nm erfolgte mit einem PC (486er) mit einer Lab-PC-1200-AD-DA-Wandlerkarte (National Instruments). Zusätzlich zu den drei Signalen konnten die Sollwertspannungen für die Gasflussregler aufgezeichnet werden, um die Messsignale bei modulierter Anregung wie im Kapitel 10 (Gasflussmodulation an Weizen) damit korrelieren zu können.

Die analogen Ausgänge der Messkarte lieferten die Sollspannungen für die Gasflussregler. Über die digitalen Ausgänge wurde das aktinische Licht (bis max.  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in drei Stufen), die Halogenlampe und der zugehörige Shutter angesteuert. Softwareseitig erfolgte die Programmsteuerung und Datenerfassung mit derselben Software wie auch auf dem FC-Messplatz.

### 4.5.3 Mess- und Steuersoftware

Das bereits im Abschnitt 4.5.1 erwähnte selbst erstellte Messprogramm findet sich als Blockdiagramm in der Abbildung 4.14. Es hatte zwei Aufgaben zu erfüllen: Aufzeichnung der Messwerte der Analog-Digital-Wandlung für bis zu acht Kanäle und Ansteuerung der verschiedenen Parameter (z.B. Blitzlampe und Shutter, aktinisches Licht, Fernrot-Licht,  $\text{CO}_2$ - und  $\text{O}_2$ -Konzentrationen) zu den vorgegebenen Zeitpunkten. Dabei konnten mehrere Messungen hintereinander durchgeführt werden mit gleichen oder unterschiedlichen Messprotokollen.

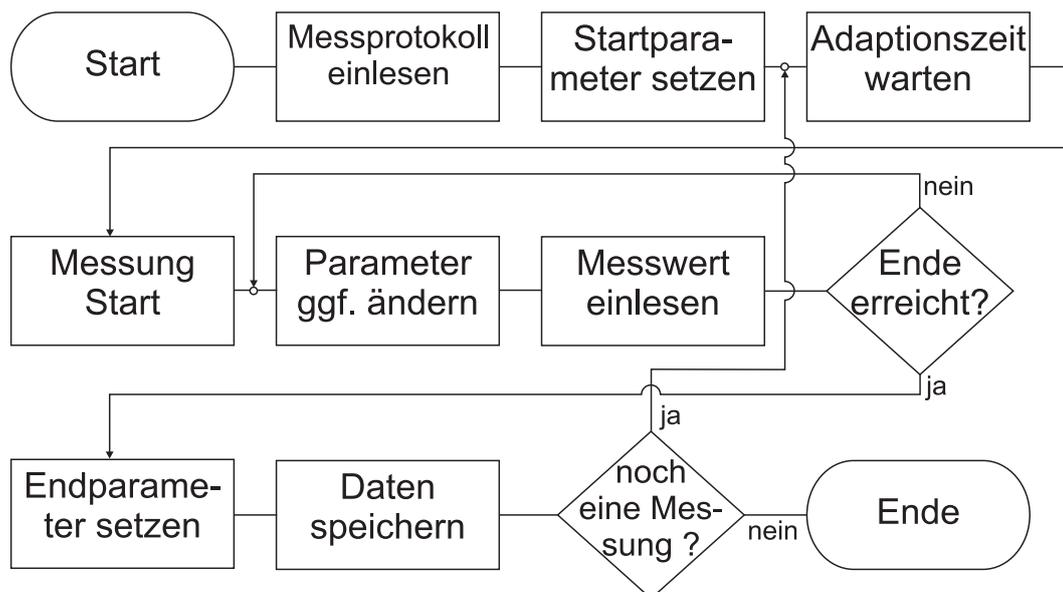


Abbildung 4.14: Blockdiagramm der verwendeten Mess- und Steuersoftware. Erläuterungen zu den einzelnen Punkten finden sich im Text.

An den im Diagramm 4.14 eingezeichneten Punkten passiert das Folgende (dabei bedeutet „Parameter“ stets die vom Messprogramm geforderten Werte für die Ausgangssignale, also die genannten Lichtquellen und Gas-Konzentrationen):

- *Messprotokoll einlesen*: In einem Messprotokoll (einer ASCII-Datei) werden die Schaltpunkte der verschiedenen Parameter definiert, also welcher Wert zu welchem Zeitpunkt vorherrschen soll. Dabei können Wiederholungen (z. B. sättigende Blitze alle 30 s) durch Schleifen übersichtlich gekennzeichnet werden. Zu Beginn wird diese Protokoll-Datei eingelesen, welche auch Parameter für mehrere Messungen hintereinander enthalten kann. Das Programm verwendet später die zu der jeweiligen Messung passenden, welche unterschiedlich sein können.

- *Startparameter setzen*: Vor der Messung werden die Startwerte entsprechend gesetzt, damit in der ersten Adaptionsphase die Bedingungen wie zur Messung vorherrschen können (z.B. der Gasfluss).
- *Adaptionszeit warten*: Zu Beginn jeder Messung kann eine bestimmte Zeit gewartet werden, damit sich das Blatt an die eventuell geänderten Parameter oder auch an die Dunkelheit anpassen kann.
- *Messung Start*: Die AD-Wandler werden initialisiert und auf die gewünschte Sampling-Rate eingestellt.
- *Parameter ggf. ändern* und *Messwerte einlesen* bilden die eigentliche Messschleife: Es wird bei jedem Durchgang kontrolliert, ob die Parameter geändert werden sollen (Vorgabe des Messprotokolles); falls ja, wird dies durchgeführt. Danach werden die nächsten Messwerte vom Wandler abgeholt. Dies können auch mehr als einer sein, weil das Timing der Messaufnahme von der Wandlerkarte gesteuert und ggf. die Daten gepuffert werden, bis das Programm sie abholt. Da auf diese Weise das eigentliche Wandeln der analogen Daten automatisch erfolgt, das Setzen der Parameter aber zeitkritisch ist (für eine einfachere Auswertung müssen z.B. Blitze sehr genau zum richtigen Zeitpunkt angeschaltet werden), wird das Abholen der Daten aus dem Kartenpuffer jeweils automatisch vor und nach den Parameteränderungspunkten unterbrochen und später nachgeholt.
- *Endparameter setzen*: Ist das Ende einer Messung erreicht, so werden die Endparameter (analog zu den Startparametern) gesetzt. Folgt danach noch eine weitere Messung, so dienen diese wieder als Startparameter.
- *Daten speichern*: Die Messreihen werden als ASCII-Datei auf die Festplatte geschrieben, wobei der vorgegebene Dateiname automatisch um die Nummer der Messung (bei Serien) ergänzt wird.
- Nun wird entweder das Programm beendet oder eine weitere Messung durchgeführt, welche wieder mit dem Abwarten der Adaptionszeit beginnt.

Die Frequenzgang-Messungen in den Kapiteln 9 und 11 erforderten eine abgewandelte Version der Messsoftware. Abb. 4.15 zeigt hierzu das Blockschaltbild.

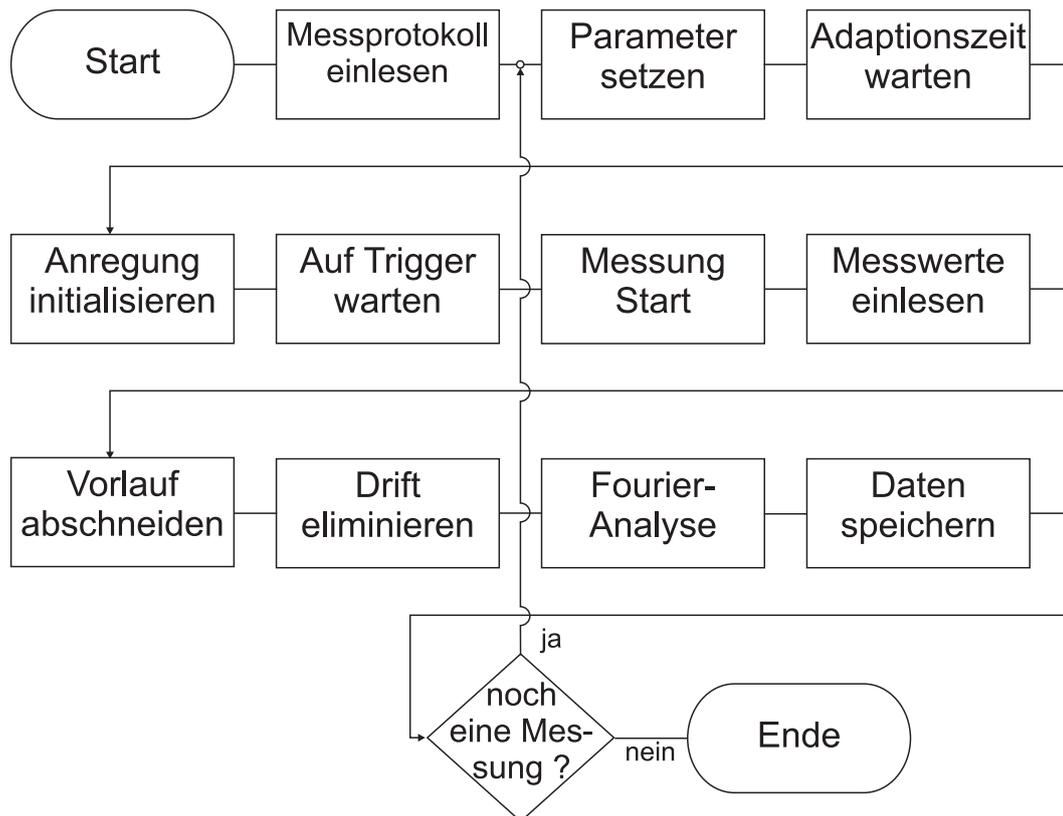
Da bei Frequenzgang-Messungen die Phasenlage wichtig ist, musste in diesem Programm der Start der Messung sehr genau erfolgen. Deshalb wurde dieser Beginn automatisch auf den Nulldurchgang des Anregungssignales (CO<sub>2</sub> bzw. O<sub>2</sub>) getriggert. So konnten Anregung und Messsignal phasenstarr aufgezeichnet werden, weshalb die Richtung des Durchganges (steigend oder fallend) hier keine Rolle spielt. Diese Messdaten wurden dann auf die richtige Länge geschnitten (meistens drei oder sechs Perioden), wobei der Einschwingteil am Anfang entfernt wurde. Danach erfolgte die Elimination der Drift (siehe unten). Aus den so erhaltenen korrigierten Messdaten wurden dann zusammen mit der aufgezeichneten Anregungskurve die Fourier-Koeffizienten  $a$  und  $b$  berechnet mit den folgenden Gleichungen:

$$a = \frac{2}{N} \sum_{i=0}^{N-1} y_i \cdot g_{i+d} \quad (\text{cos - Anteil}) \quad (4.10)$$

$$b = \frac{2}{N} \sum_{i=0}^{N-1} y_i \cdot g_i \quad (\text{sin - Anteil}) \quad (4.11)$$

Dabei ist

- $N$  : Zahl der Messpunkte
- $y_i$  : Messwert zum Abtastzeitpunkt  $i$
- $g_i$  : Wert der Gasanregung zum Zeitpunkt  $i$
- $d$  : Zahl der Datenpunkte in einer Viertelperiode



**Abbildung 4.15:** Blockdiagramm der verwendeten Software für die Frequenzgangmessungen. Erläuterungen finden sich im Text.

Daraus berechnen sich die Amplitude  $A$  und die Phase  $\varphi$ :

$$A = \sqrt{a^2 + b^2} \quad (4.12)$$

$$\varphi = \arctan \frac{a}{b} + \begin{cases} 0 & \text{bei } b \geq 0 \\ \pi & \text{bei } b < 0 \end{cases} \quad (4.13)$$

Die dabei ermittelten Werte sowie die Originalmessdaten wurden auf die Festplatte gespeichert. Mit einer entsprechenden Messparameter-Datei können so automatisch  $\text{CO}_2$ - und  $\text{O}_2$ -Frequenzgänge bei verschiedenem aktinischen Licht gemessen werden, ohne dass ein Eingriff des Experimentators nötig ist.

### Driftelimination

Die Frequenzgangmessungen dauerten zum Teil mehrere Stunden. Dabei entstand eine Drift in der Messapparatur, welche eliminiert werden musste, um die Auswertung nicht zu verfälschen. Nach der Einschwingphase liefern Punkte mit derselben Phase des Anregungssignales gleiche Ergebnisse, nur die Drift verfälschte diese. Deshalb wurden für jeden Messzeitpunkt  $k$  Differenzen der Messwerte  $y_k$  über eine Periode gebildet ( $P$ : Zahl der Punkte pro Periode):

$$D_k = \frac{y_{k+P} - y_k}{P} \quad (4.14)$$

$D_k$  ist dann die jeweilige Drift-Steigung zwischen zwei Punkten. Die Drift wurde mit einem Polynom des Grades  $N$  angenähert. Mit diskret abgetasteten Werten an den Zeitpunkten  $t = kT$  ( $T$ : Abtastrate) ergab sich dann der Polynomwert für  $k$ :

$$z_k = \sum_{i=0}^N a_i \cdot k^i \quad (4.15)$$

oder in Matrix-Schreibweise mit  $x_{ij} = j^i$ :

$$\vec{z} = X \cdot \vec{a} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 1 & \dots \\ 1 & 2 & 4 & \dots \\ 1 & 3 & 9 & \dots \\ 1 & 4 & 16 & \dots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots \end{pmatrix} \cdot \vec{a} \quad (4.16)$$

Die Driftwerte als Vektor waren dann:

$$\vec{\eta}_D = \begin{pmatrix} D_1 \\ \vdots \\ D_t \end{pmatrix} \quad (4.17)$$

Die Annäherung des Driftpolynoms an die Driftwerte erfolgte über die Berechnung des Lotes zwischen  $K \cdot \vec{a}$  und  $\vec{\eta}_D$  (Kief, 1988). Aus der Projektion ergab sich dann der Vektor für das Driftpolynom:

$$\vec{a} = (X^T X)^{-1} X^T \cdot \vec{\eta}_D \quad (4.18)$$

Die neuen driftkorrigierten Messwerte  $\tilde{y}_k$  ergaben sich dann aus:

$$\tilde{y}_k = y_k - \left( \sum_{i=0}^N a_i k^{i+1} \cdot \frac{1}{i+1} \right) - d_0 \quad (4.19)$$

Dabei korrigierte  $d_0 = \sum a_i$  den Nullpunkt. In der Formel steht  $\left( k^{i+1} \cdot \frac{1}{i+1} \right)$  statt  $k^i$ , um die Ableitung aus der Differenzbildung in Gleichung 4.14 wieder auszugleichen.

#### 4.5.4 Auswertungssoftware

Um die Daten der verschiedenen Messprotokolle verarbeiten zu können, wurde ebenfalls unter LabVIEW ein Programm zur Auswertung erstellt. Dieses bietet unter anderem die folgenden Funktionen:

- *Laden und Speichern*: Hierbei werden ASCII-Dateien in verschiedenen Formaten unterstützt, wobei als Dezimaltrenner wahlweise ein Punkt oder ein Komma verwendet werden kann. Dies ist u.a. deshalb nötig, da die später verwendeten Fit-Routinen nur spezielle Formate lesen können. Je nach Bedarf können mehrere Dateien zusammen eingelesen werden, um die Datenreihen dann zusammen verarbeiten und speichern zu können.
- *Daten bearbeiten*: Es können Ausreißer entfernt werden, welche als Störung bei der Messaufnahme entstehen und eindeutig an ihrer geringen Breite identifizierbar sind. Danach können die Datenreihen verschoben, skaliert und geschnitten werden, auch die Bearbeitung einzelner Punkte ist möglich.
- *Verschiebung in x-Richtung*: Zum Beispiel bei der Auswertung mehrerer Messungen mit sättigenden Blitzen ist es nötig, die Flanken exakt aufeinander zu positionieren. Hierzu können in einer vergrößerten Darstellung die x-Werte dieser Stellen erfasst und dann auf denselben Punkt verschoben werden.
- *Messwerte bestimmen*: Für die Erfassung einzelner Parameter einer Messkurve (z.B. Thermik und Elektronenfluss oder Sprunghöhen) können diese Punkte einfach mit einem Cursor markiert und auf Tastendruck gespeichert werden. Ist die Aufnahme beendet, können diese Datentabellen einfach über die Zwischenablage des Rechners z. B. in Excel importiert werden.

- *Änderung der Sampling-Rate*: In den Fällen, wo die Auszeichnung mit einer hohen Datenrate erfolgte, für eine Übersichtsdarstellung aber weniger Daten erwünscht sind, kann eine Mittelung zwischen den Datenpunkten erfolgen. Dies ist besonders bei den später verwendeten Fit-Programmen nötig, da diese nur 50 Punkte verarbeiten können. Diese Komprimierung kann auch mit einer logarithmischen Skala geschehen, was insbesondere dann wichtig ist, wenn mit e-Funktionen gefittet werden soll.
- *Dateilisten*: Häufig wurden Messreihen unter verschiedenen Bedingungen gemacht (z. B. hintereinander wenig und viel aktinisches Licht). Für die Auswertung mussten dann die Dateien zusammengeführt werden, die nur zu der jeweils gewünschten Bedingung passen. Eine einmal zu diesem Zweck erstellte Dateiliste kann gespeichert werden, um dann diese Zusammenstellung jederzeit schnell wieder laden zu können. Wurden Messungen fortlaufend nummeriert (z.B. die mit wenig Licht xxx und die mit viel xxx+1), so können auch die jeweils anderen Bedingungen geladen werden, indem z. B. eine 1 hinzuaddiert wird.
- *Makro*: Schließlich erlaubt eine Makro-Funktion die automatische Ausführung vieler dieser Funktionen mit einem Mausklick oder direkt nach dem Laden der Daten.

## Kapitel 5

# Klassische Chlorophyll-Fluoreszenzsignale

Wie in der Einleitung beschrieben, geht es bei der vorliegenden Arbeit um zwei Fragenkomplexe:

1. Gibt es in der Chlorophyll-Fluoreszenz Parameter, die sich dazu eignen, Pilzbefall per Fluoreszenz vom fahrenden Trecker anzuzeigen?
2. Welche metabolischen Prozesse, die Ursache für pilzinduzierte Änderungen der Chlorophyll-Fluoreszenz sein könnten, sind beteiligt?

Für beide Fragen hat die Untersuchung pilz-induzierter Änderungen der Chlorophyll-Fluoreszenz eine Schlüsselstellung. Bei der ersten ist sie Ziel der Untersuchung, bei anderen ein wichtiger Messzugang.

### 5.1 Messaufbau und Ablauf

Die hier dargestellten Messungen benutzen den etablierten Ansatz, den Schreiber et al. (1986) für das zum Weltstandard gewordene Fluorometer (PAM) entwickelten: die Messung der Induktionskurve mit sättigenden Blitzen (Abschnitt 4.4.4). Abweichend vom ursprünglichen Messverfahren wird hier das FC-Prinzip eingesetzt (ebenfalls Abschnitt 4.4.4).

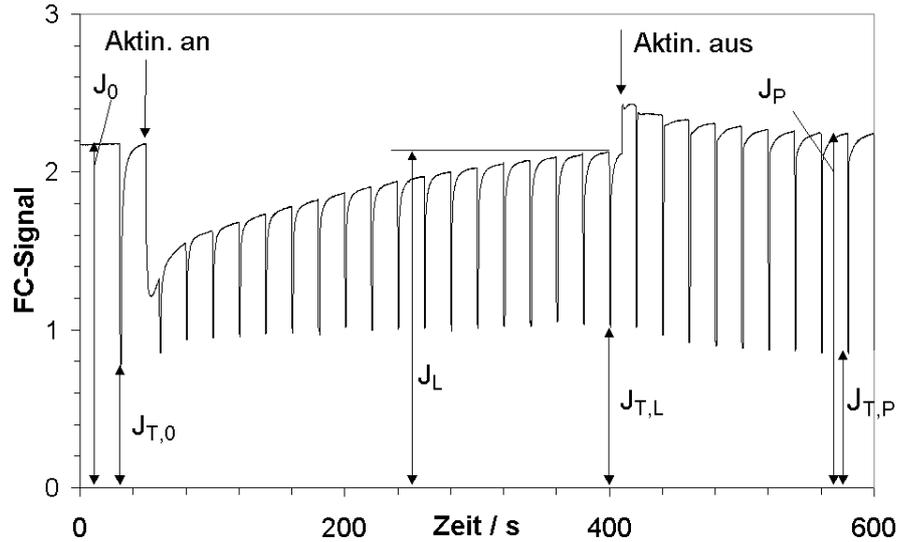
Abb. 5.1 zeigt an einer typischen Messung die ermittelten Parameter, welche unter jeweils vier Lichtbedingungen am selben Blatt durchgeführt wurden:

- Low-Light ( $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),
- High-Light ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),
- Low-Light + Dauer-FR ( $6,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),
- High-Light + Dauer-FR ( $6,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

#### 5.1.1 Einsatz von Stoffwechsellinhibitoren

Hierfür wurden die Blätter unter Wasser abgeschnitten und über Nacht in die geeignete Lösung gestellt. Folgende Inhibitoren kamen zum Einsatz, wobei statt destilliertem Wasser Standard-Medium (SM: 1 mM KCl, 1mM CaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,2) verwendet wurde:

- Kontrolle: 1mM SM,
- SHAM: 5mM in 1mM SM,
- Glyceraldehyd: 10mM in 1mM SM.



**Abbildung 5.1:** Messung einer FC-Induktionskurve mit dem Sättigungsblitzprotokoll nach Schreiber et al. (1986). Die im folgenden benutzten Auswertungsparameter sind hier definiert. An den Pfeilen oben wurde das aktinische Licht an- bzw. ausgeschaltet.

### 5.1.2 Auswertung

Die Parameter wurden aus den Messungen ermittelt, wie in der Abbildung 5.1 gezeigt:

Der Gesamtfluss  $J_i$  (gemessen kurz vor dem Blitz), der thermische Fluss  $J_{T,i}$  (gemessen während des Blitzes) und der photochemische Elektronenfluss  $J_{P,i}$  (Impulslänge) hängen wie folgt zusammen:

$$J_{P,i} = J_i - J_{T,i} \quad i = 0, L, P \quad (5.1)$$

Zur Mittelung wurden sie, wie in Abb. 5.1 dargestellt, an drei verschiedenen Zeitpunkten während der Messung bestimmt:

**Dunkel** : Blitz in der Dunkelheit,  $J_{P,0}$ ,  $J_{T,0}$

**Licht** : Blitz am Ende der Hellphase (ca. 400 s),  $J_{P,L}$ ,  $J_{T,L}$

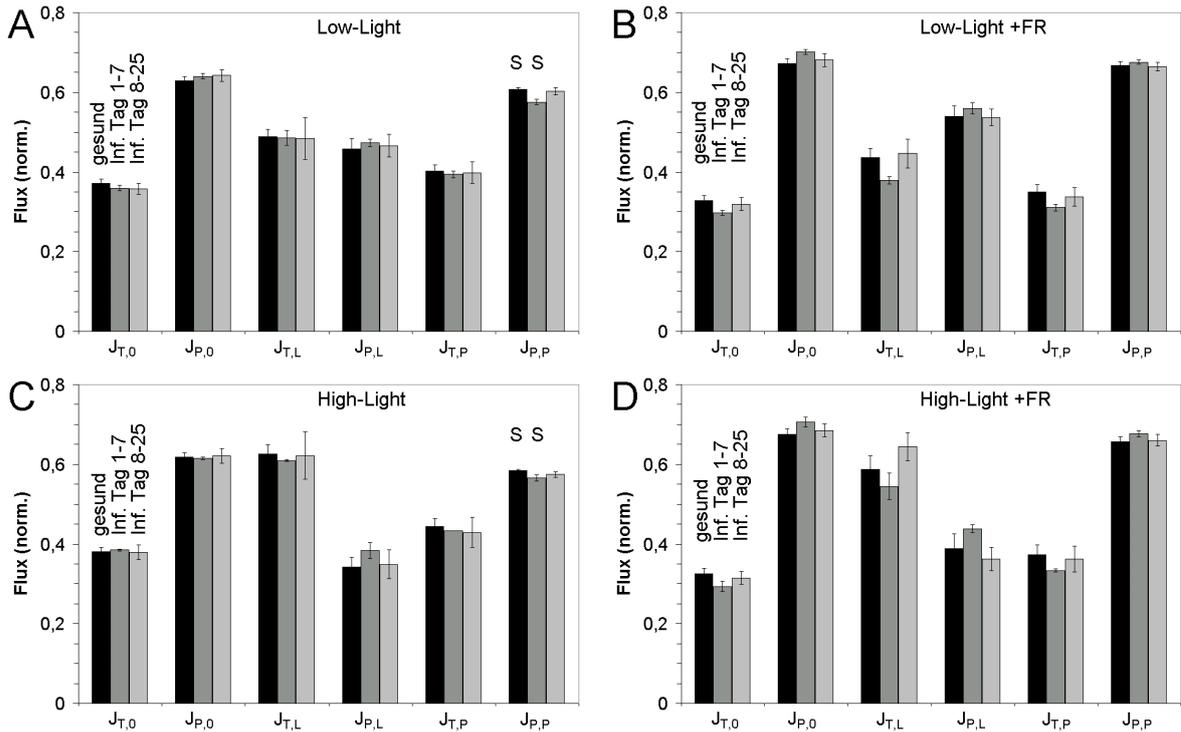
**nach Licht** : Letzter Blitz der Messung (nach Licht) ,  $J_{P,P}$ ,  $J_{T,P}$

In den Abbildungen wurden die Messdaten jeweils auf  $J_0$  normiert und über gleiche Messbedingungen gemittelt. Die infizierten Blätter wurden in den folgenden Auswertungen in die Bereiche „1–7 Tage“ und „8–25 Tage“ nach Infektion aufgeteilt, um kurz- und langfristige Einflüsse unterscheiden zu können. Mit Hilfe des t-Tests (SPSS,  $p=0.05$ ) wurden die Mittelwerte auf statistisch signifikante Unterschiede getestet.

## 5.2 Ergebnisse bei gesunden und infizierten Blättern

Abb. 5.2 zeigt eine Zusammenstellung der in Abb. 5.1 definierten Parameter  $J_P$  und  $J_T$  bei unvergifteten gesunden und infizierten Blättern.

Bei Low-Light (Abb. 5.2A) zeigen sich nur beim Elektronenfluss nach Beleuchtung ( $J_{P,P}$ , letzte Säulengruppe) signifikante Unterschiede ( $p=0.05$ ) zwischen gesunden und vor 1–7 Tagen infizierten Blättern. Unter High-Light (Abb. 5.2C) sind nur kleine Veränderungen gegenüber LL zu finden, auch hier ist  $J_{P,P}$  zwischen „gesund“ und „1–7 Tage“ signifikant verschieden. Der Unterschied zwischen „gesund“ und „1–7“ Tage ist auch bei den anderen Signalen in Abb.



**Abbildung 5.2:** Unterschiede zwischen gesunden (jeweils linke Säule) und vor 1–7 Tagen (mittlere Säule) bzw. 8–25 Tagen mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern. Aufgetragen sind die Mittelwerte der FC-Parameter Thermik ( $J_T$ ) und Elektronenfluss ( $J_P$ ) an drei Zeitpunkten der Messung (siehe Text). Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit „S“ gekennzeichnet ( $p=0.05$ ). (A) Low-Light, (B) LL mit FR-Hintergrundlicht, (C) High-Light, (D) HL mit FR.

5.2A,C deutlicher als zwischen „gesund“ und „vor 8–25 Tagen infiziert“, wenngleich dies nicht statistisch signifikant ist.

Abb. 5.2B und D zeigen die gleichen Messungen wie in Abb. 5.2A bzw. C, nur jetzt mit FR-Hintergrundlicht ( $6,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Dabei treten zwischen „gesund“ und „vor 1–7 Tagen infiziert“ deutlichere Unterschiede auf als in den Nachbargraphen ohne FR-Licht. Insbesondere fällt ein inverses Verhalten von thermischen und elektrochemischen Flüssen auf: Die Thermik wird im Zeitbereich 1–7 Tage nach Infektion unter allen Bedingungen gegenüber den Werten von gesunden Blättern erniedrigt, während der photochemische Fluss erhöht wird. Dies gilt sowohl unter LL (5.2B) als auch unter HL (5.2D). Obwohl die Fehlerbalken nicht überlappen, ergibt der t-Test auf einem Niveau von  $p=0.05$  immer noch keine Signifikanz. Diese ergibt sich erst im Abschnitt 5.4 durch die Zusammenfassung in Gruppen.

Die Zunahme des photochemischen Flusses bei Infektion (1–7 Tage) unter FR (Fig. 5.2B,D) zeigt das entgegengesetzte Verhalten wie ohne FR nach Licht ( $J_{P,P}$ ) in Abb. 5.2A,C. In der Diplomarbeit Hammes (2000) fand sich bei den ohne FR gemessenen Induktionskurven eine Erniedrigung des Elektronenflusses (entspricht den mit „S“ markierten Säulen in Abb. 5.2A,C) und eine Zunahme der Thermik bei infizierten Weizenblättern, die in Abb. 5.2A,C allerdings nicht angedeutet ist.

### 5.3 Gesunde und infizierte Blätter mit Inhibitoren

Die Unterschiede zwischen den Fluoreszenzantworten von infizierten und nicht infizierten Blättern in Abb. 5.2 sind nicht sehr stark. Im Folgenden wird untersucht, ob diese Unterschiede unter Inhibitorwirkung deutlicher werden. Insbesondere dienen Inhibitormessungen dazu, Hinweise auf die beteiligten metabolischen Reaktionen zu bekommen.

Die in Abb. 5.2 dargestellten Messungen sind als Kontrollbalken in Abb. 5.3 mit eingetragen. In den Abbildungen 5.3 und 5.4 finden sich die Daten von den Infektionstagen 8–25. Die Werte von den Infektionstagen 1–7 werden in Abb. 5.5 gezeigt.

Um gesunde und infizierte Blätter direkt vergleichen zu können, wurden die Mittelwerte der Messparameter der gesunden Blätter von den infizierten abgezogen, also „infiziert“ minus „gesund“ gerechnet. Die zugehörigen Darstellungen finden sich in den Abbildungen 5.3E,F und 5.4E,F für die Tage 8–25 bzw. in 5.5E-H für Tag 1–7 nach Infektion. Die Balken, bei denen sich die zugehörigen Mittelwerte für „infiziert“ und „gesund“ signifikant unterscheiden (t-Test,  $p=0.05$ ), sind mit „\*“ markiert. Der t-Test findet keine Signifikanzen unter LL-Bedingungen. Da aber die spätere Zusammenfassung von Messungen zu signifikanten Unterschieden führen wird, seien hier schon einmal die in Abb. 5.3 auftretenden Trends besprochen: In allen folgenden Messungen ist es eigentlich nur SHAM, das sichtbare Unterschiede gegenüber den unvergifteten Blättern bewirkt. Glyceraldehyd wirkt sich kaum aus.

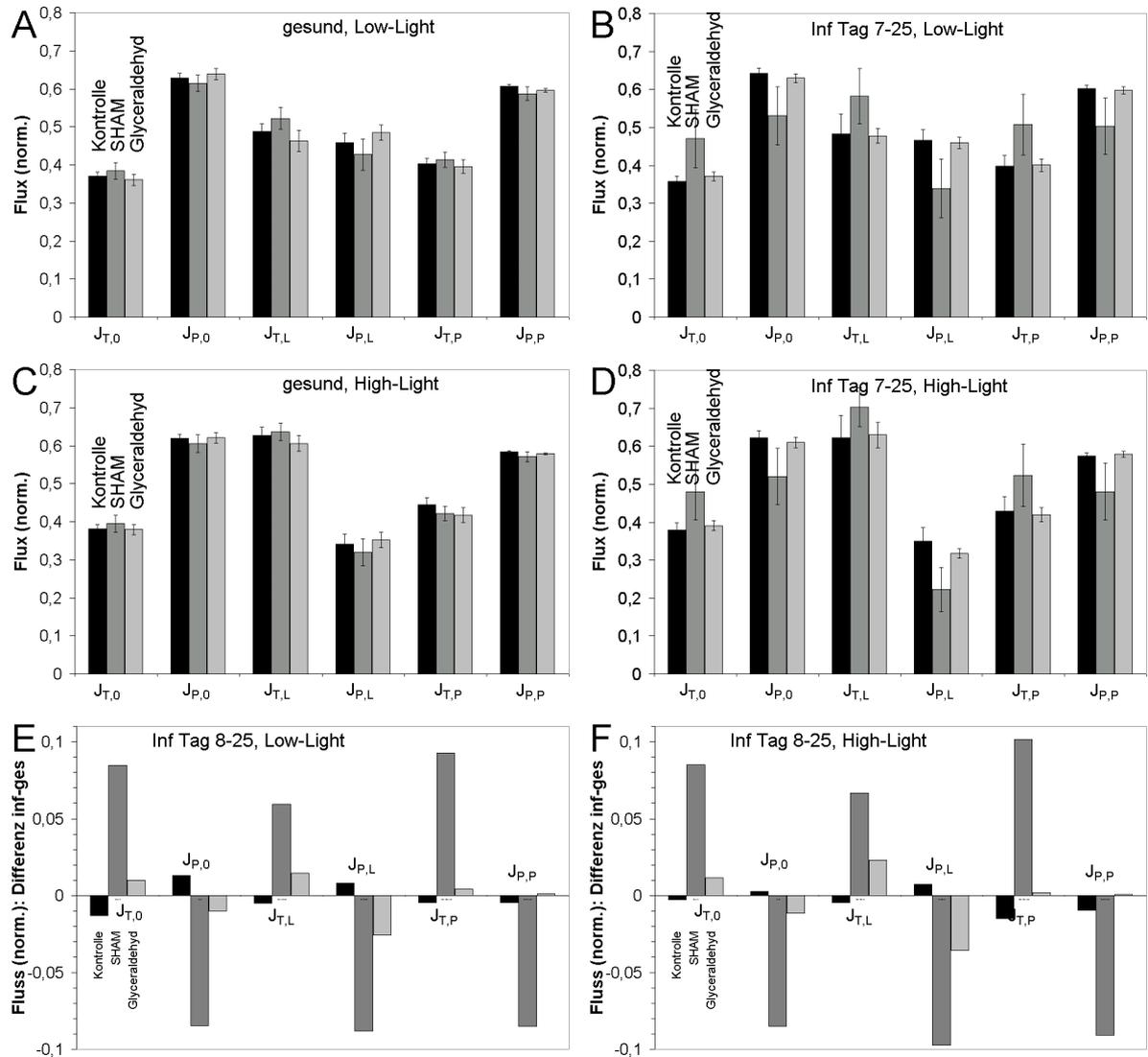
Bei den gesunden Blättern mit Low-Light (Abb. 5.3A) verursacht SHAM beim photochemischen Fluss in Dunkelheit und im Licht eine leichte Erniedrigung. Der zugehörige thermische Fluss ist erhöht. Bei High-Light (Abb. 5.3C) sind diese Effekte schwächer. Es gilt aber wieder die in bereits in Abb. 5.2 gefundene Regel, dass eine Erhöhung der Thermik mit einem inversen Effekt auf den photochemischen Fluss einhergeht.

Bei vor 8–25 Tagen infizierten Blättern unter Low-Light (Abb. 5.3B) treten diese Effekte deutlicher hervor: Die Thermik unter SHAM ist immer höher als die Wasser-Kontrolle, und der photochemische Fluss ist generell erniedrigt. Zwischen Glyceraldehyd und Wasser treten wieder keine Unterschiede auf.

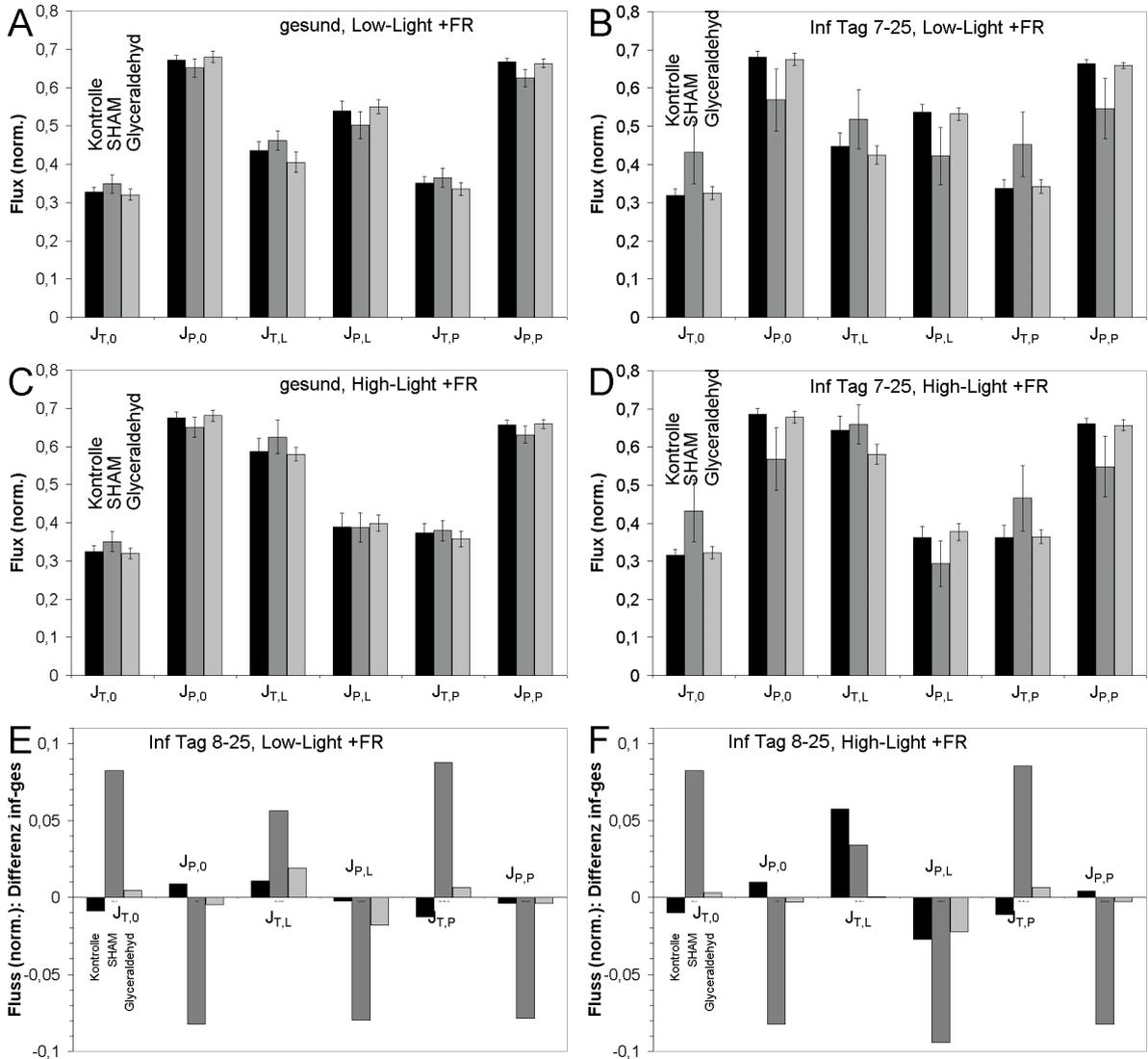
Keine der Veränderungen durch die Gifte besteht allerdings den Signifikanztest. Dies liegt an der hohen Streuung, die dadurch verursacht wird, dass jede Messung an einem neuen Blatt stattgefunden hat. So kommen zu den Variationen durch die Infektion auch noch die des Blattes hinzu. Signifikante Unterschiede ergeben sich erst, wenn diese Messungen im Abschnitt 5.4 zu Gruppen zusammengefasst werden.

In Abb. 5.3E,F sind die Differenzen infiziert–gesund aus den darüberliegenden Daten aufgetragen. Hier wird der SHAM-Effekt sehr deutlich, insbesondere das komplementäre Verhalten von thermischem und photochemischem Fluss sowohl unter Low- als auch unter High-Light. Glyceraldehyd verhält sich hier von der Tendenz wie SHAM, nur sind die Änderungen viel kleiner.

Abb. 5.4 zeigt die gleichen Messungen wie in Abb. 5.3 nur mit zusätzlichem konstanten FR-Licht ( $6,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Hier ergibt sich aus allen Diagrammen eine Tendenzverstärkung: Die Effekte von SHAM treten etwas stärker hervor. Wieder zeigt sich das komplementäre Verhalten von thermischem Fluss (erhöht unter SHAM) und photochemischem Fluss (erniedrigt unter SHAM) durchgehend. Der Vergleich zwischen infizierten und gesunden Blättern (in Abb. 5.4E,F) zeigt wie bei Abwesenheit von FR-Licht das gleiche Muster: SHAM erhöht deutlich die Thermik bei infizierten Pflanzen gegenüber den gesunden und senkt den photochemischen Fluss unter beiden Lichtstärken. Die Kontrolle zeigt nur kleine Änderungen: Nur die Thermik unter High-Light im Licht ( $J_{T,L}$ ) ist bei den infizierten Pflanzen deutlich höher als bei den gesunden (gespiegelt in der Erniedrigung von  $J_{P,L}$ ), ebenso bei Glyceraldehyd (Abb. 5.4F).



**Abbildung 5.3:** Inhibitor-Wirkung auf die Fluoreszenzparameter aus FC-Messung (ohne FR, Tag 8–25): Thermik ( $J_T$ ) und Elektronenfluss ( $J_P$ ) nach Gleichung 5.1 in Dunkelheit (die linken beiden Säulengruppen), am Ende der Aktin-Licht-Phase (die mittleren beiden Säulen) und am Ende der Phase nach Beleuchtung (die rechten Säulen) mit verschiedenen Giften bei gesunden und mit *Septoria tritici* vor 8–25 Tagen infizierten Weizenblättern. Auf  $J_0$  normiert, Mittelwerte über 4–5 Messungen, Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. (A) gesund, Low-Light ( $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (B) infiziert, LL, (C) gesund, High-Light ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (D) infiziert, HL (E) Vergleich infiziert–gesund LL, (F) Vergleich infiziert–gesund HL.

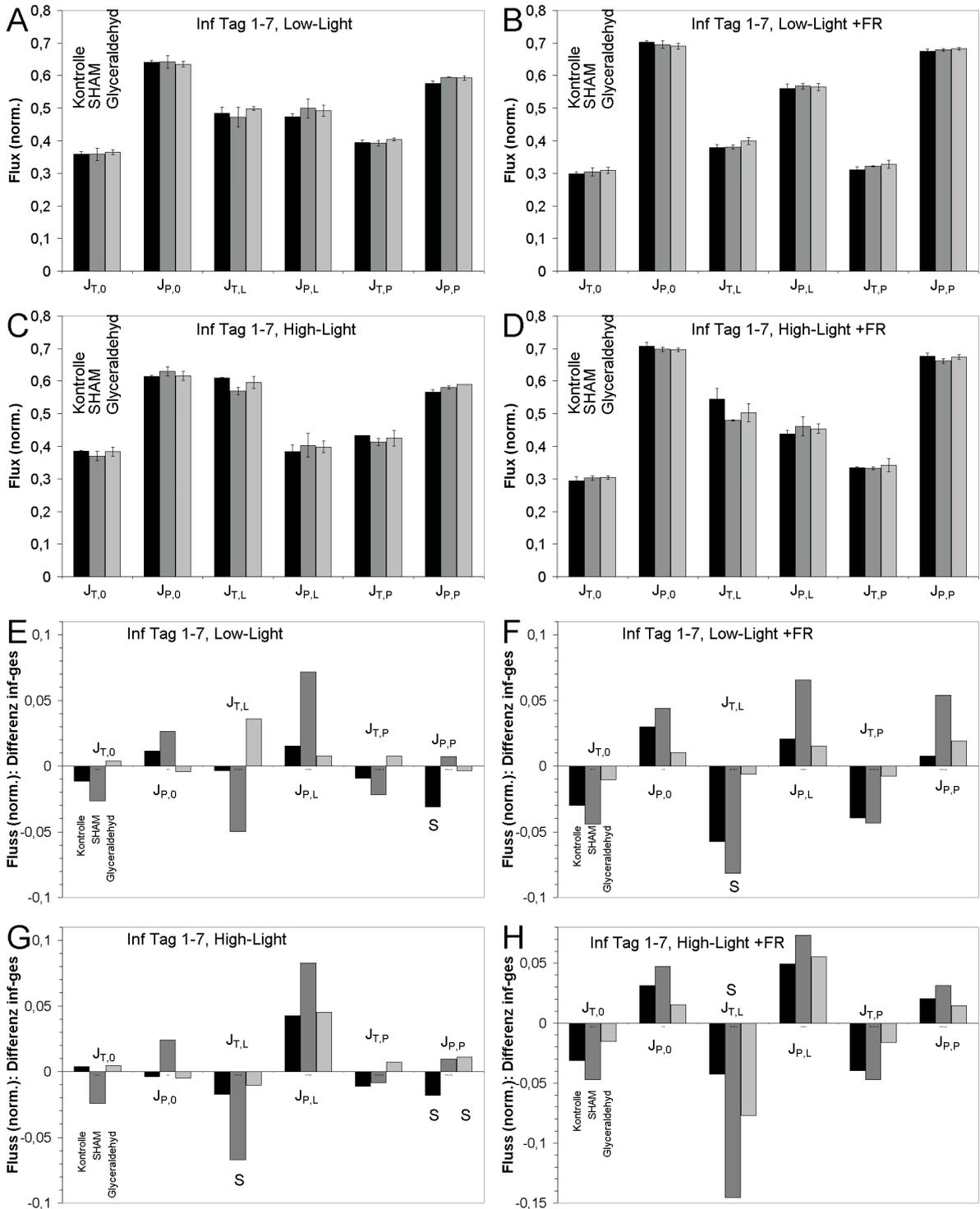


**Abbildung 5.4:** Inhibitor-Wirkung auf die Fluoreszenzparameter aus FC-Messung (mit FR, Tag 8–25): Thermik ( $J_T$ ) und Elektronenfluss ( $J_P$ ) nach Gleichung 5.1 in Dunkelheit (die linken beiden Säulengruppen), am Ende der Aktin-Licht-Phase (die mittleren beiden Säulen) und am Ende der Phase nach Beleuchtung (die rechten Säulen) mit verschiedenen Giften bei gesunden und mit *Septoria tritici* vor 8–25 Tagen infizierten Weizenblättern mit FR-Hintergrundlicht ( $6,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Auf  $J_0$  normiert, Mittelwerte über 4–5 Messungen, Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. (A) gesund, Low-Light ( $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (B) infiziert, LL, (C) gesund, High-Light ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (D) infiziert, HL, (E) Vergleich infiziert–gesund LL, (F) Vergleich infiziert–gesund HL.

Bei den Messungen an den Tagen 1–7 nach Infektion in Abbildung 5.5 sind die Unterschiede in der Inhibitorwirkung und der der Infektion kaum noch erkennbar, welche bei der Infektion vor 8–25 Tagen noch deutlich auftraten. Dies gilt ganz besonders für die Low-Light-Messungen ohne (Abb. 5.5A) und mit FR (Abb. 5.5B). Nur die Thermik im Licht ( $J_{T,L}$ ) ist unter SHAM etwas geringer als die Kontrolle im Gegensatz zur Situation bei Tag 8–25 (Abb. 5.3B und 5.4B), wo  $J_{T,L}$  unter SHAM höher ist als die Kontrolle.

Bei High-Light ohne (Abb. 5.5C) und mit FR (Abb. 5.5D) kehrt sich die Situation bei SHAM im Vergleich zu den Messungen bei Tag 8–25 (Abb. 5.3D und 5.4D) nahezu um: Die Thermik ist jetzt nicht höher, sondern niedriger oder gleich mit der Kontrolle. Und der Elektronenfluss ist im Gegensatz dazu nicht mehr niedriger, sondern gleich mit der Kontrolle. Alle diese Unterschiede sind allerdings nicht signifikant.

Der Vergleich der infizierten mit den gesunden Blättern (Abb. 5.5E–H) zeigt hier ein etwas anderes Bild als vorher: Zwar bleibt das komplementäre Muster erhalten, dass der thermische Fluss sich invers zum photochemischen verhält, aber SHAM erniedrigt jetzt die Thermik bei den infizierten im Vergleich zu den gesunden Blättern, dafür ist der photochemische Fluss größer geworden. Insbesondere bei der Thermik im Licht ( $J_{T,L}$ ) ist dies bis auf LL ohne FR signifikant. Unter FR-Licht (Abb. 5.5F,H) findet sich bei der Wasserkontrolle und bei Glyceraldehyd ein analoges Bild zu SHAM, nur sind hier die Änderungen kleiner. Ohne FR-Licht (Abb. 5.5E,G) ist der photochemische Fluss ( $J_{P,P}$ ) der Kontrolle bei infizierten Blättern signifikant kleiner als bei gesunden. Unter High-Light (Abb. 5.5G) ist auch für Glyceraldehyd  $J_{P,P}$  signifikant verschieden zwischen infizierten und gesunden Blättern, nur ist der Fluss hier größer geworden.



**Abbildung 5.5:** Inhibitor-Wirkung auf die Fluoreszenzparameter aus FC-Messung (Tag 1–7): Thermik ( $J_T$ ) und Elektronenfluss ( $J_P$ ) nach Gleichung 5.1 in Dunkelheit (die linken beiden Säulengruppen), am Ende der Aktin-Licht-Phase (die mittleren beiden Säulen) und am Ende der Phase nach Beleuchtung (die rechten Säulen) mit verschiedenen Giften mit *Septoria tritici* vor 1–7 Tagen infizierten Weizenblättern. Auf  $J_0$  normiert, Mittelwerte über 2–5 Messungen, Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Die zugehörigen gesunden Kontrollen finden sich in den Abbildungen 5.3 und 5.4 „S“ kennzeichnet Balken, bei denen die Mittelwerte der Messungen an gesunden und infizierten Blätter signifikant verschieden sind ( $t$ -Test,  $p=0.05$ ). (A) Low-Light ( $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (B) LL mit FR, (C) High-Light ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (D) HL mit FR (E) Vergleich infiziert-gesund LL, (F) Vergleich infiziert-gesund LL mit FR, (G) Vergleich infiziert-gesund HL, (H) Vergleich infiziert-gesund HL mit FR.

## 5.4 Zusammenfassung in Gruppen

Wegen der hohen Streuung sind in den Abbildungen 5.3, 5.4 und 5.5 die besprochenen Trends nicht signifikant, wohl aber deutlich erkennbar. Deshalb erfolgt hier ein neuer Test: Da diese Unterschiede sich in verschiedenen Messungen bei dem photochemischen Fluss und der Thermik ähnlich verhalten, werden im Folgenden die Messungen der drei Zeitpunkte zusammen analysiert. Auf diese Weise bekommt man drei Messungen vom selben Blatt (Dunkelheit, im Licht und nach Licht), die zusammen gemittelt werden können, statt nur einer. Allerdings unterscheiden sich die Säulengruppen in ihrer Absoluthöhe (z. B. in Abb. 5.3A die Säulengruppen für  $J_{T,0}$  und  $J_{P,0}$ ). Deshalb werden alle Messwerte eines Signales (z. B.  $J_{P,P}$ ) über alle Bedingungen gemittelt. Der sich dabei ergebende Normierungsfaktor wird danach auf die Messwerte des zugehörigen Signales angewandt. Die Mittelwerte aus diesen normierten Werten wurden erneut auf statistisch signifikante Unterschiede getestet (t-Test,  $p=0.05$ ).

Diese Unterschiede zwischen infizierten und gesunden Blättern sind in Tabelle 5.1 dargestellt. Man erkennt, dass die Daten aus Abbildung 5.2 nur unter FR-Licht signifikante Aussagen liefern. Mit FR-Hintergrundlicht findet man eine signifikante Verminderung des thermischen Flusses bei infizierten Blättern im Zeitraum von 1 bis 7 Tagen. Mehr Aussagen sind aus diesen Messungen nicht zu gewinnen.

**Tabelle 5.1:** Vergleich gesund–infiziert: Signifikanz-Tests an den Chlorophyll-Fluoreszenz-Parametern aus der Abbildung 5.2: Die jeweils drei Säulengruppen zu Thermik und Photochemischer Fluss wurden normiert und zusammengefasst (Details im Text). Ein „+“ in dieser Tabelle bedeutet, dass der Wert der infizierten Blätter gegenüber den gesunden signifikant erhöht ist. Ein „-“ zeigt das Gegenteil an. Leere Felder bedeuten einen nicht signifikanten Unterschied (t-Test,  $p=0.05$ ).

	Low-Light				High-Light			
	-FR		+FR		-FR		+FR	
	1	8	1	8	1	8	1	8
Inf von Tag:	1	8	1	8	1	8	1	8
bis Tag:	7	25	7	25	7	25	7	25
gesund ( <i>Thermik</i> )			–				–	
gesund ( <i>Phot.Fluss</i> )								

Der Einfluss der Gifte bei verschiedenen Infektionszuständen („gesund“ gegen „Inf. Tag1–7“ und „Inf. Tag8–25“) ist in Tabelle 5.2 zusammengestellt. Dies geschah für jede Lichtbedingung getrennt und alle drei Gifte jeweils gegeneinander (Kontrolle–SHAM, Kontrolle–Glyceraldehyd, SHAM–Glyceraldehyd). Ein „+“ bedeutet, dass der jeweilige Wert für das 2. Gift gegenüber dem vom 1. Gift erhöht ist, „-“ zeigt das Gegenteil an. Tabelle 5.2 zeigt wieder das bereits oben erwähnte komplementäre Verhalten der SHAM-Wirkung auf Thermik und photochemischen Fluss bei infizierten Pflanzen, aber nur im Bereich „8–25 Tage“: Ein Pluszeichen in der Thermik bei „Kontrolle gegen SHAM“ unter allen Bedingungen und ein Minuszeichen bei den entsprechenden Stellen beim photochemischen Fluss. Bei Pflanzen, die nur vor 1-7 Tagen infiziert waren, ergibt sich bei High-Light ohne FR ein inverser Effekt: Erniedrigung der thermischen und Erhöhung des photochemischen Flusses. Dieser Effekt wird auch bei gesunden Pflanzen unter LL mit FR signifikant.

Glyceraldehyd gibt nur unter einer Bedingung ein signifikantes Ergebnis: Erhöhung des thermischen Flusses unter LL + FR im Zeitbereich „1-7 Tage“ für infizierte Blätter. Der Vergleich „SHAM gegen Glyceraldehyd“ ergibt das inverse Verhalten von „Kontrolle gegen SHAM“, während Glyceraldehyd sich selbst von der Kontrolle kaum unterscheidet.

Insgesamt zeigt der Signifikanztest in Tabelle 5.2, dass die in den Abbildungen 5.2 bis 5.5 sichtbaren Effekte real, aber nicht sehr ausgeprägt sind. Sie sind für die Forschung nutzbar, aber nicht für den Feldeinsatz.

**Tabelle 5.2:** Vergleich der Giftwirkung: Signifikanz-Tests an den Chlorophyll-Fluoreszenz-Parametern aus den Abbildungen 5.3, 5.4 und 5.5: Die jeweils drei Säulengruppen zu Thermik und Photochemischer Fluss wurden normiert und zusammengefasst (Details im Text). K=Kontrolle, S=SHAM, G=Glycerladehyd. Ein „+“ in dieser Tabelle bedeutet, dass der Wert der 2. Behandlung gegenüber der 1. signifikant erhöht ist. Ein „-“ zeigt das Gegenteil an (z. B.: „Inf. Tag8-25“, K gegen S: Das „+“ bedeutet, dass SHAM gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht ist.) . Leere Felder bedeuten einen nicht signifikanten Unterschied ( $t$ -Test,  $p=0.05$ ).

Thermik	Low-Light						High-Light					
	-FR			+FR			-FR			+FR		
1. Behandlung:	K	K	S	K	K	S	K	K	S	K	K	S
2. Behandlung:	S	G	G	S	G	G	S	G	G	S	G	G
gesund			-	-		-						
Inf. Tag 1-7					+		-					
Inf. Tag 8-25	+		-	+		-	+		-	+		-

Photochemischer Fluss	Low-Light						High-Light					
	-FR			+FR			-FR			+FR		
1. Behandlung:	K	K	S	K	K	S	K	K	S	K	K	S
2. Behandlung:	S	G	G	S	G	G	S	G	G	S	G	G
gesund						+						
Inf. Tag 1-7												
Inf. Tag 8-25	-		+	-		+	-		+	-		+

## Kapitel 6

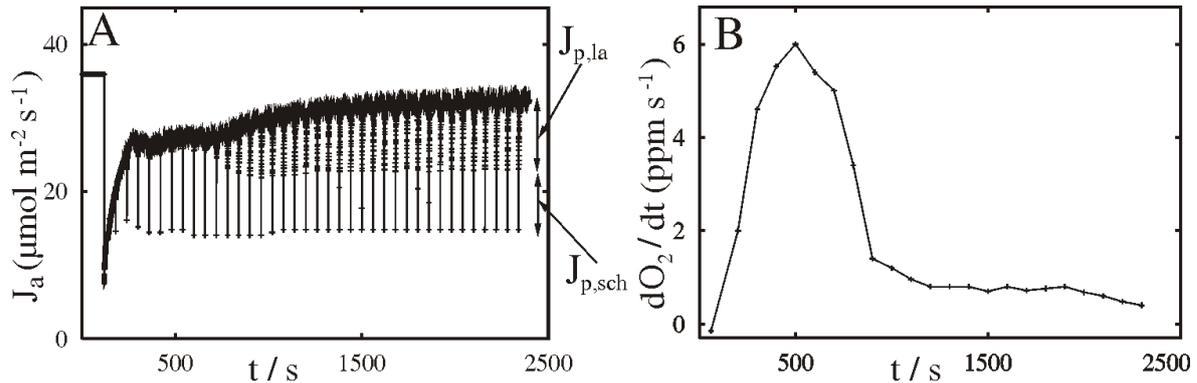
# Analyse der Blitzrückstellflanken nach sättigenden Blitzen

Die Chlorophyll-Fluoreszenz eines intakten Blattes wird hauptsächlich von zwei verschiedenen Prozessen bestimmt: dem photochemischen und dem nicht-photochemischen Quenching (Schreiber und Bilger, 1993; Schreiber und Krieger, 1998, siehe auch Abschnitt 4.4.2). Das Standard-Messverfahren zur Trennung dieser beiden Anteile ist die Sättigungsblitzmethode (Schreiber et al., 1986, siehe Abschnitt 4.4.4). In einem solchen Experiment wird der Status des photosynthetischen Apparates mit einem PAM-Fluorometer oder der FC-Maschine (Abschnitt 4.4.4) mit einem schwachen Messlicht erfasst, und dann werden Änderungen mit einem stärkeren aktinischen Licht induziert. Während eines zusätzlich in bestimmten Zeitabständen eingeschalteten sättigenden Blitzes wird der photochemische Weg durch die vollständige Reduktion des primären Akzeptors von PS II geschlossen. Dann wird der Yield (siehe Abschnitt 4.4.3) nur noch von der nicht-photochemischen Komponente bestimmt. Auf diese Weise lassen sich die beiden oben genannten Anteile trennen. Die höchste Punkt des während des Blitzes vorherrschenden Peaks in der Chlorophyll-Fluoreszenz wird  $F_M^i$  genannt (van Kooten und Snel, 1990).

Dieser Ansatz wird überall in der Photosynthese-Forschung eingesetzt. Dennoch findet ein Charakteristikum wenig Beachtung: die Rückstellflanke der Blitzantwort nach Abschaltung, also die Phase, wenn die Photosynthese zum normalen Betrieb nach dem sättigenden Licht zurückkehrt. Diese Rückstellflanke besteht aus einer schnellen und einer langsamen Komponente. In den meisten Experimenten wird die langsame Phase wahrscheinlich übersehen, da sie meist viel kleiner ist als die schnelle. Insbesondere bei Messungen mit dem PAM-Protokoll ist die Auflösung für die langsame Komponente zu ungünstig, denn sie tritt am Ende des  $F_M$ -Peaks auf, wo die Fluoreszenzänderung nur gering auf Flussänderungen reagiert.

Besser erkennbar wird die langsame Rückstellkomponente in Fluorescence-Clamp-Messungen (FC, Abschnitt 4.4.4). Da bei diesem Ansatz ein Regelkreis über die Messlicht-LEDs die Fluoreszenz konstant hält, ist dieser LED-Strom ein direktes Maß für den Exzitonenfluss aus der PS-II-Antenne. Somit misst das FC-Prinzip Flüsse und nicht Anregungszustände der Antenne (Schinner et al., 2000). Im Gegensatz zu klassischen Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen liefert FC einen linearen Zusammenhang zwischen Signal und Fluss. Deshalb gibt es keine Probleme mit einer kleineren Skalierung bei großen Flüssen, und die Rückstellflanke wird deutlich erkennbar.

Die Motivation für die Messungen in diesem Kapitel stammen aus einer Beobachtung aus Schinner et al. (2001b), dass der Anteil der langsamen Komponente der Blitzrückstellflanke auf bis zu 50% anwächst, wenn das  $\text{CO}_2$  in der geschlossenen Messkammer verarmt (in Abb 6.1 gezeigt). Um die Aufmerksamkeit auf eine mögliche Verwendung der Analyse der Rückstellflanken als Werkzeug zur Untersuchung der Entladevorgänge der Pools in der ETC zu lenken, werden hier Experimente gezeigt, die die Einflüsse von Stoffwechsel-Inhibitoren auf die Entladung des PS-I-Akzeptor-Pools aufzeigen.



**Abbildung 6.1:** (A) Auftauchen von langsamen Rückstellflanken bei sättigenden Blitzen (Exzitonenfluss bei FC-Messungen) an  $\text{NH}_4^+$ -ernährter Bohne. (B) Die parallel gemessene Sauerstoffentwicklung bei  $\text{CO}_2$ -Verarmung in der Messkammer der Clark-Elektrode. Ergebnisse aus Schinner et al. (2001b).

## 6.1 Messaufbau und Ablauf

Die Messungen fanden mit dem im Abschnitt 4.5.1 (S. 40) beschriebenen FC-Aufbau statt. Der Weizen wurde aufgezo-gen wie im Abschnitt 4.1.2 beschrieben. Die Blätter wurden unter Wasser abgeschnitten und über Nacht in die entsprechenden Lösungen gestellt, so dass diese mit dem Transpirationsstrom aufgenommen werden konnten. Folgende Inhibitoren kamen zum Einsatz (siehe auch 4.3, S. 29) zusammen mit der Wasser-Kontrolle:

- 10 mM *Glyceraldehyd*: Inhibitor des Calvin-Zyklus
- 20 mM *SHAM*: Inhibitor der Alternative Oxidase in den Mitochondrien, aber auch der Chlororespiration,
- 10  $\mu\text{M}$  *Antimycin A*: Inhibitor des zyklischen Elektronentransportes um PS I und Elektronenfluss des Weges von Komplex III zu Komplex IV in den Mitochondrien (Cytochrom-Weg),
- 10  $\mu\text{M}$  *Oligomycin*: Inhibitor der mitochondrialen ATPase.

Die Weizenblätter wurden in die Messkammer wie im Abschnitt 4.5.1 beschrieben gelegt und dem folgenden Programm unterworfen:

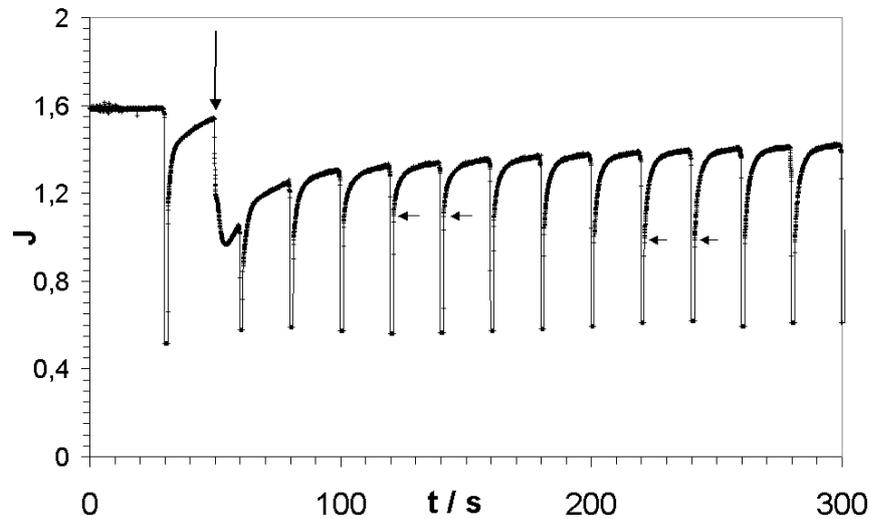
- 10 Minuten Dunkeladaption,
- 10 Minuten messen bei Low-Light ( $\text{LL}=290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),
- 5 Minuten Dunkeladaption,
- 10 Minuten messen bei High-Light ( $\text{HL}=700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Eine Messung von 10 min Dauer bestand dabei aus einer Aktin-Licht-Phase, die von 50 bis 410 s dauerte, und einer Dunkelphase davor und danach. Es wurden alle 20 Sekunden sättigende Blitze gegeben. Alle hier gezeigten Messungen fanden „nach Licht“, d. h. 120 s nach Ausschalten des aktinschen Lichtes statt.

## 6.2 Die langsame Komponente der Blitzrückstellflanke

Von einem unvergifteten Weizenblatt wurde ein Stück von 3,5 cm Länge abgeschnitten und in die Messkammer auf feuchtes Papier gelegt. Nach einer Dunkeladaption von 10 min mit

eingeschaltetem Messlicht wurde die Kammer zu Beginn der Messung kurz belüftet und dann gasdicht verschlossen. Nach 60 sec. wurde das aktinische Licht ( $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) eingeschaltet. Das Ergebnis einer solchen Messung findet sich in der Abb. 6.2.



**Abbildung 6.2:** Wiederholung der Messung aus Schinner et al. (2001b) mit einem Weizenblatt in einer geschlossenen Kammer: Man sieht, dass die Rückstellflanke des FC-Signals als Antwort auf einen sättigenden Blitz zwei Phasen enthält. Die Messlichtintensität betrug max.  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Das aktinische Licht ( $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wurde bei dem mit dem Abwärtspeil markierten Zeitpunkt eingeschaltet.

Diese Abbildung zeigt eine Wiederholung des Experimentes von Schinner et al. (2001b) im selben Versuchsaufbau. Dort ist der gleiche Anstieg der langsamen Phase der Rückstellflanke mit zunehmender  $\text{CO}_2$ -Verarmung zu erkennen. Die erneute Messung war nötig, da für die folgende Analyse die Abtastrate bei Schinner et al. (2001b) zu niedrig war (jetzt 1 kHz statt vorher 5 Hz).

Am unteren Ende der Blitzpeaks besteht der Yield des Signals ( $J'_M$ , was  $1/F'_M$  bei einer PAM-Messung entspricht, Schinner et al., 2001b) nur noch aus dem Fluss, der zum nicht-photochemischen Quenching gehört. Nach dem Ende des sättigenden Blitzes kehrt das FC-Signal wieder zum aktuellen Wert auf der Induktionskurve zurück. Dieser Signalanstieg zeigt die Wiederherstellung der photochemischen Flüsse an. In Abb. 6.2 wird deutlich, dass diese Rückstellflanke aus zwei Phasen besteht: einer schnellen und einer langsamen. Um diese Phasen besser erkennen zu können, sind in der Abbildung die Datenpunkte alle 30 ms eingezeichnet, so dass sich auf dem schnellen Teil der Flanke fast keine finden.

Während der Messung in Abb. 6.2 verbraucht das ausgeschnittene, photosynthetisch aktive Blatt das  $\text{CO}_2$  in der Messkammer. Wie schon bei Schinner et al. (2001b) gezeigt, ist der Anstieg der langsamen Komponente direkt an den Abfall der  $\text{O}_2$ -Bildung gekoppelt, welche mit einer Clark-Elektrode im selben Aufbau gemessen wurde. Da dies dort deutlich genug war, wurde dieser Teil des Experimentes nicht wiederholt. Der Effekt der  $\text{CO}_2$ -Verarmung in der geschlossenen Kammer ist hier nicht so dramatisch wie vorher bei Schinner et al. (2001b), welcher dort an Bohne gemessen wurde. Dennoch ist er hier deutlich erkennbar.

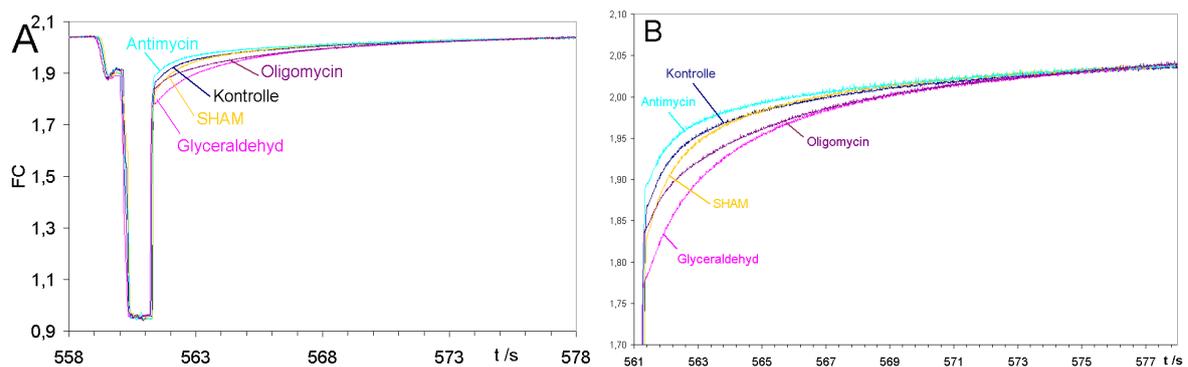
Der Beginn der langsamen Phase (siehe auch Abb. 6.3) kann besser auf dem Computerbildschirm mit hoher Auflösung erkannt werden (Original-Sampling-Rate: 1 kHz). Diese Punkte sind in der Abbildung 6.2 durch horizontale Pfeile markiert. Sie zeigen an, dass bei der Blitzantwort bei ca. 140 s der langsame Anteil ca.  $28\% \pm 2\%$  der gesamten Rückstellflanke ausmacht. Die Blitze in diesem Bereich wurden deshalb gewählt, weil dort die Induktionskurve durchlaufen wurde und die Thylakoid-Membran genügend stark energetisiert war, um den Calvin-Zyklus anzutreiben.

Nach ungefähr 200 s erreicht der Anteil der langsamen Komponente einen stabilen Wert von  $48\% \pm 3\%$  (zweites Paar horizontale Pfeile), wenn das  $\text{CO}_2$  in der Kammer verarmt ist wie bei Schinner et al. (2001b). Wichtig ist anzumerken, dass diese Veränderungen nicht auf das Energy-Quenching (Thermik) zurückzuführen sind, denn die unteren Enden der Blitz-Peaks verändern ihre Höhe nicht.

### 6.3 Einfluss von Inhibitoren

Der in Abbildung 6.2 gezeigte Effekt auf die langsame Komponente der Blitzrückstellflanken wird nun verwendet, um den Einfluss von Stoffwechsel-Inhibitoren auf die Entladung des Akzeptor-Pools von PS I zu untersuchen. Dazu wurden Weizenblätter, wie im Abschnitt 6.1 beschrieben, mit den genannten Inhibitoren beladen. Im Gegensatz zu den Messungen in Abb. 6.2 wurde bei den folgenden die Messkammer nicht geschlossen, sondern ein kleiner Spalt erlaubte den Gasaustausch.

Die Blätter wurden 300 s lang aktinischem Licht von  $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ausgesetzt, um die Enzyme der ETC zu aktivieren. Der Effekt auf die Rückstellflanken wurde 140 s nach Ausschalten dieses Lichtes analysiert, da sich herausgestellt hatte, dass die Einflüsse der Inhibitoren am deutlichsten nur bei Messlicht nach einer Vorbeleuchtung waren.



**Abbildung 6.3:** Einfluss der Inhibitoren auf die langsame Komponente der Blitzrückstellflanken im FC-Modus gemessen. Die Messungen wurden 120 s nach dem Ausschalten des aktinischen Lichtes ( $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durchgeführt. Die Kurven zeigen eine Mittelung über jeweils 10 Versuche. Die Streuung ist der Übersicht halber nicht gezeigt, ergibt sich aber aus den Fit-Daten in Tabelle 6.1. (A) Überlagerung verschiedener Blitz-Antworten unter verschiedenen Behandlungen. (B) Vergrößerter Ausschnitt von A, der die langsame Komponente der Rückstellflanke mit höherer Auflösung zeigt.

Abbildung 6.3A zeigt die Mittelwerte von kompletten Blitzantworten (auf die gleiche Höhe normiert) bei verschiedenen Inhibitoren. In 6.3B ist der entscheidende Bereich vergrößert dargestellt, um die Inhibitor-Einflüsse auf die langsame Phase der Rückstellflanke sichtbar zu machen. Das Artefakt in Abbildung 6.3A zu Beginn des Blitzes hat seine Ursache in der für diese Messungen verwendeten Shutter-Konstruktion, was aber keinen Einfluss auf die Rückstellflanken hat.

Es ist nicht verwunderlich, dass Glycerinaldehyd den größten Anstieg der langsamen Komponente in Abb. 6.3B verursacht (also am langsamsten zurückgeht), da diese Behandlung (Inhibition des Calvin-Zyklus) eine ähnliche Wirkung hat wie die  $\text{CO}_2$ -Verarmung aus Abb. 6.2. Der Effekt von Oligomycin ist kleiner als der von Glycerldehyd. SHAM zeigt weniger deutliche Auswirkungen, deren Reabilität wahrscheinlich nur mit verbesserten Experimentierbedingungen überprüfbar wäre. Interessant ist der Effekt von Antimycin: Der langsame Anteil der Rückstellflanke ist kleiner als der von der Kontrollkurve.

## 6.4 Numerische Auswertung der Effekte auf die Rückstellflanken

### 6.4.1 Prozesse und Zeitkonstanten, die zur Form der Rückstellflanke beitragen

Die Rückstellflanke als Antwort auf einen sättigenden Blitz erhält ihre charakteristische Form von den folgenden Prozessen (wie in Abb. 3.2 gezeigt): Während des Blitzes wird  $Q_A$  vollständig reduziert. Der Plastoquinon-Pool und der Pool der PS-I-Akzeptoren stellen sich auf ein Redox-Level ein, das sich aus dem Zufluss von Elektronen von  $Q_A/Q_B$ , dem von PS I getriebenen Abfluss und der Reoxidation der PS-I-Akzeptoren von nachfolgenden metabolischen Prozessen ergibt. Die gesamte Rückstellflanke der Blitzantwort (bestimmt durch die Entladung von  $Q_A$ ) besteht aus den folgenden Schritten:

1. Transfer der Elektronen von  $Q_A$  zu PQ,
2. Transfer von PQ zu den primären Akzeptoren von PS I,
3. Entladung der Akzeptoren von PS I.

Hansen et al. (1991, 1993) ordneten die folgenden Zeitkonstanten der Modulation des Pools zu:

- $Q_A$  ( $\tau_1$ ),
- PQ ( $\tau_2$ ),
- PS I-Akzeptoren ( $\tau_3$ ),
- Zeitkonstanten mit Indizes größer als 4 sind noch nicht identifiziert, aber es gibt wahrscheinliche Annahmen zu  $\tau_{5a}$ : Lichtinduzierte Aufnahme von  $Ca^{2+}$  in die Chloroplasten (Vanselow und Hansen, 1989; Plieth et al., 1998) und zu  $\tau_6$ : „State Transitions“ (Hansen et al., 1987, 1991, 1993; Dau und Canaani, 1992).
- Eine zusätzliche Veränderung des gemessenen Gesamt-FC-Fluss kann durch geändertes Energy-Quenching ( $\tau_4$ ) hervorgerufen werden.

Die Konstanten ( $\tau_1$ ) bis ( $\tau_4$ ) bewegen sich in einem Zeitbereich von 0 – 20 s. Dies ist der Bereich der sichtbaren Komponenten der Rückstellflanke in Abbildung 6.3. Die Abwesenheit der sehr langsamen Komponenten (mit Nummer größer als 4) erleichtert die Auswertung. Dieses Fehlen kommt wahrscheinlich daher, dass es sich bei den Rückstellflanken um Puls-Antworten handelt, bei denen die Komponenten mit  $1/\tau$  gewichtet sind. Außerdem werden diese Komponenten während des im Verhältnis dazu kurzen Blitzes (Dauer 1 s) nicht hinreichend aufgeladen.

Die Identifikation der beteiligten Komponenten muss mit der Frage beginnen, ob die Rückstellflanken vom nicht-photochemischen Fluss ( $\tau_4$ ) oder von photochemischen ( $\tau_1$  bis  $\tau_3$ ) Flüssen verursacht werden. Nicht-photochemische Flüsse können mit der folgenden Argumentation ausgeschlossen werden:

- Man könnte annehmen, dass während des Blitzes der pH-Gradient über der Thylakoid-Membran ansteigt. Dies kann aber mit dem Experiment in Abb. 6.2 ausgeschlossen werden (und zeigt sich noch dramatischer in dem Versuch bei Schinner et al., 2000): Während der Verarmung an atmosphärischem  $CO_2$  steigt der Anteil der langsamen Komponente der Rückstellflanke auf 50% der gesamten, durch den Blitz induzierten Exzitonen-Fluss-Reduktion, ohne dass sich der Gesamtpeak  $J'_M$  ändert. Wenn dieser Anstieg der langsamen Komponente aufgrund von verändertem nicht-photochemischen Quenching passieren würde, dann müsste sich  $J'_M$  nach oben verschieben. Dies wird aber nicht beobachtet. Es gibt keine Änderung in dem unteren Ende des Peaks während der Blitz-Antwort, das heißt, das nicht-photochemische Quenching bleibt unverändert.

- In Experimenten, die den Einfluss von Stoffwechsel-Inhibitoren studieren, steigern sowohl Glyceraldehyd als auch mitochondriale Gifte die langsame Komponente. Wenn diese im Zusammenhang mit der Thylakoid-Energetisierung stehen würde, sollte sich der gegenteilige Effekt bei Glyceraldehyd und den mitochondrialen Blockern in Abb. 6.3 beobachten lassen.

### 6.4.2 Fit der Rückstellflanken

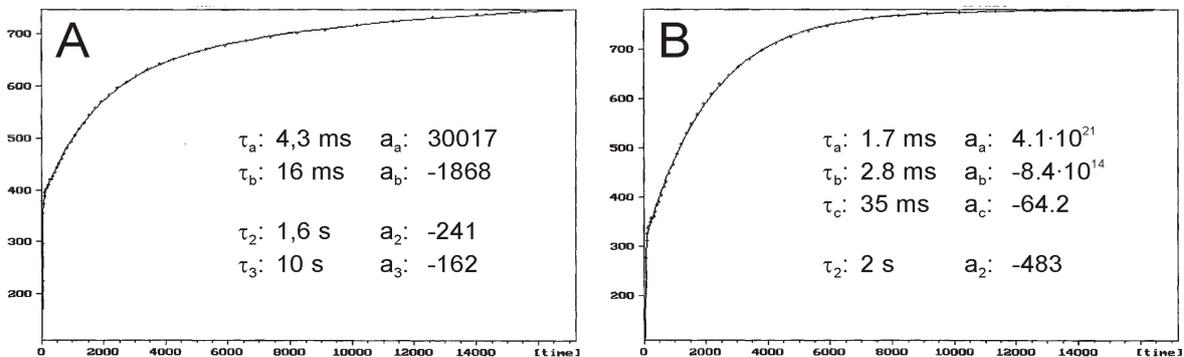
Um die beteiligten Prozesse im photochemischen Quenching zu identifizieren, wird der langsame Anteil der Rückstellflanken aus Abb. 6.3B mit einer Kurve angefitet. Die Theorie der linearisierten Antworten (Hansen et al., 1991) verlangt, dass dazu eine Summe von Exponentialfunktionen verwendet wird (Vanselow et al., 1989):

$$f(t) = \sum_{i=\{a,b,c,2,3\}}^n a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (6.1)$$

Dabei sind  $\tau_i$  die Zeitkonstanten und  $a_i$  die zugehörigen Amplitudenfaktoren. Gute Fits erfordern 4–5 Zeitkonstanten.

In den unten dargestellten Ergebnissen der Fits sind die zwei bis drei schnellsten Zeitkonstanten nicht gezeigt. Sie haben nur eine Hilfsfunktion bei der Elimination der Artefakte, die am Anfang des Rückstellflanke auftreten und die aufgrund der Abtastrate sowieso nicht genügend hoch aufgelöst wurden. Deshalb werden nur die beiden langsamen Komponenten aus Gleichung 6.1, welche aus den Messungen in Abb. 6.2 und 6.3 gewonnen wurden, betrachtet. Diese werden  $\tau_2$  und  $\tau_3$  nach der Nomenklatur von Hansen et al. (1991, 1993) zugeordnet, da ihre Werte gut in das von den Autoren erstellte Muster und auch zu Vanselow et al. (1989) passen.

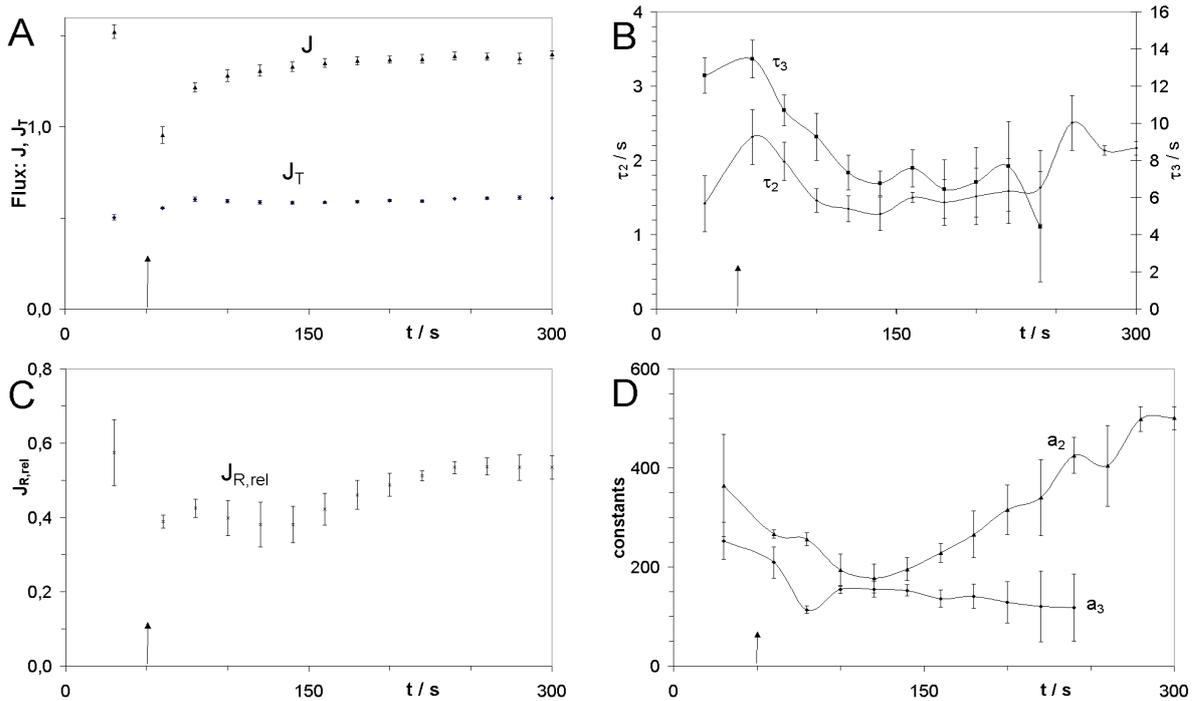
### Einfluss der CO<sub>2</sub>-Verarmung



**Abbildung 6.4:** Beispiele für Fits der Blitzrückstellflanken mit Hilfe der Gleichung 6.1. Die Kurven stammen aus den Experimenten mit CO<sub>2</sub>-Verarmung von den Zeitpunkten (A) 100 s und (B) 240 s. Die Fitparameter sind im Bild angegeben. Die schnellen Zeitkonstanten sind mit a,b,c nummeriert, die langsamen mit 2 und 3; siehe Text.

Abbildung 6.4 zeigt zwei Beispiele für Fits der Rückstellflanken, welche sich bei den Experimenten wie in Abbildung 6.2 ergeben: Eine Kurve (A) stammt von 100 s, die andere (B) von 240 s. Es wird in der Abbildung offensichtlich, dass der Fit die Datenpunkte sehr gut trifft. Die erste Kurve musste mit beiden Zeitkonstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  gefittet werden, wie man an dem Auftauchen der langsamen Komponente erkennt, für den Fit der anderen Kurve hingegen war  $\tau_3$  nicht nötig, da die langsame Komponente hier verschwunden ist.

Den kompletten Zeitverlauf der Änderungen in den Parametern  $\tau_2$ ,  $\tau_3$ ,  $a_2$  und  $a_3$  zeigt die Abbildung 6.5B bzw. D. Diese werden verglichen mit dem Zeitverhalten des Gesamt-Exzitonenflusses  $J$  und der thermischen Deaktivierung  $J_T$  in Abb. 6.5A und dem relativen



**Abbildung 6.5:** Effekt der Licht-induzierten Aktivierung der Enzyme des Calvin-Zyklus und der  $\text{CO}_2$ -Verarmung auf die Blitzrückstellflanken. Zeitverläufe (A) des Gesamt-Exzitonen-Flusses  $J$  und der thermischen Deaktivierung  $J_T$ , (B) der Zeitkonstanten  $\tau_i$  aus den Fits der Flanken mit Gleichung 6.1 (unterschiedliche Achsen), (C) des relativen Anteils  $J_{R,\text{rel}}$  der langsamen Komponente in Prozent an der gesamten Flanke, (D) der Parameter  $a_i$  aus den Fits der Flanken mit Gleichung 6.1. Mittelwerte aus drei Messungen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. An der mit dem Pfeil markierten Stelle wurde das aktinische Licht mit  $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  eingeschaltet.

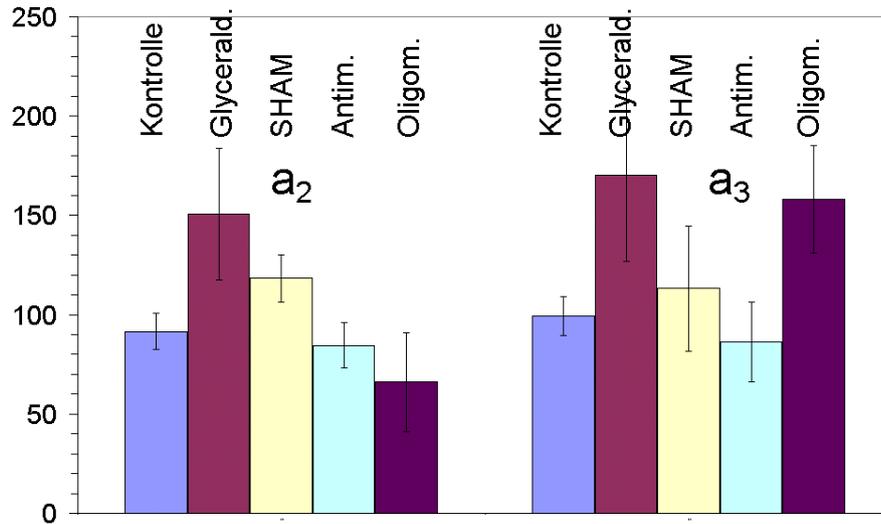
Anteil der langsamen Komponente  $J_{R,\text{rel}}$  an der gesamten Rückstellflanke (Abb. 6.5C). Vor dem Einschalten des aktinischen Lichtes bei 50 s hat die Zeitkonstante  $\tau_3 = 13,5$  s einen hohen Wert (Abb. 6.5B, rechte y-Achse). Nach dem Einschalten fällt sie und erreicht bei ungefähr 240 s ein Minimum. Auch der Amplitudenfaktor  $a_3$  fällt (Abb. 6.5D), bis diese Komponente bei ungefähr 240 s komplett verschwindet. Dies findet sich auch wieder in der Abwesenheit einer sichtbaren langsamen Komponente in der Kurve von 240 s in Abbildung 6.4B. Das Verhalten von  $\tau_2$  ist insofern ähnlich, als diese Zeitkonstante auch nach Einschalten des Lichtes fällt. Aber der Wert vor dem Einschalten ist deutlich kleiner als kurz danach, und nach 240 s steigt  $\tau_2$  wieder an; vermutlich übernimmt sie hier den Rest der verschwindenden  $\tau_3$ -Komponente. Dies hängt zusammen mit  $a_2$ , welche die stärkste Korrelation mit dem Verhalten von  $J_{R,\text{rel}}$  in Abb. 6.5C zeigt.  $J_{R,\text{rel}}$  ist die Summe aus  $a_2$  und  $a_3$ .

### Einfluss der Inhibitoren

Die Effekte der Inhibitoren, wie in der Abb. 6.3B dargestellt, wurden auch mit Hilfe des oben beschriebenen Kurven-Fits auf Basis der Gleichung 6.1 untersucht. Tabelle 6.1 gibt einen Überblick über die Mittelwerte der Zeitkonstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  und der zugehörigen Amplitudenfaktoren  $a_2$  und  $a_3$ . Letztere finden sich auch in der Abbildung 6.6. Im Falle der Zeitkonstanten in Tabelle 6.1 war die Variabilität der Fits recht groß, weshalb diese Werte hier nicht diskutiert werden. Ein Effekt ist aber deutlich in allen Fits zu finden, nämlich eine sehr deutliche Zunahme von  $\tau_2$  bei Glyceraldehyd. Bei dem momentanen Stand der Untersuchung muss davon ausgegangen werden, dass bei allen anderen Inhibitoren ein signifikanter Einfluss auf die Zeitkonstanten nicht gefunden werden kann.

**Tabelle 6.1:** Ergebnisse der Fits der langsamen Komponente der Blitz-Rückstellflanken aus Abbildung 6.3B mit der Gleichung 6.1. Mittelwerte über 5–10 Blätter pro Behandlung.

	$\tau_2 / \text{s}$	$\tau_3 / \text{s}$	$a_2$		$a_3$	
Kontrolle	1,0	8,7	-92	$\pm 27$	-99	$\pm 30$
Glyceraldehyd	1,46	5,7	-151	$\pm 74$	-171	$\pm 97$
SHAM	0,78	5,7	-118	$\pm 36$	-113	$\pm 95$
Antimycin A	0,90	9,5	-85	$\pm 28$	-86	$\pm 49$
Oligomycin	0,85	6,7	-66	$\pm 56$	-158	$\pm 60$



**Abbildung 6.6:** Amplitudenfaktoren  $a_2$  und  $a_3$  aus den Fits der Kurven aus Abb. 6.3B, welche auch in Tabelle 6.1 zu finden sind. Erläuterung zu Mittelung und Fehlerbalken im Text. Lichtintensität:  $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Interessanter ist das Verhalten der Amplituden-Faktoren  $a_2$  und  $a_3$ . In der Abbildung 6.6 stellt die Höhe der Balken den Wert der Amplitudenfaktoren da, wie sie aus den Fits der gemittelten Kurven gewonnen wurden. Da es aber so pro Balken nur einen Fit gab, können daraus keine Fehlerbalken ermittelt werden. Um trotzdem ein Maß für die Zuverlässigkeit zu bekommen, wurde die Fehlerstreuung aus den Fits der einzelnen Kurven entnommen, die zu der gemittelten in der Abb. 6.3B beigetragen haben. Dieser Ansatz ist nicht ganz korrekt. Allerdings muss beachtet werden, dass die Nicht-Orthogonalität der Exponentialfunktionen zu Ungenauigkeiten führt, welche bewirken, dass der Fit der Mittelwerte andere Resultate bringt als die Mittelwerte der Einzelfits. Das Mitteln der Kurven vor dem Fitten sollte aber bessere Ergebnisse liefern. Will man hingegen die Mess-Streuung abschätzen, so ist ein kleiner Fit-Fehler für diesem Zweck vernachlässigbar, weshalb hierfür die Daten aus den Fits der Einzelkurven verwendbar sind.

Wie bereits in der Abb. 6.3B gezeigt, hat Glyceraldehyd auf  $a_2$  und  $a_3$  (Abb. 6.6) einen deutlichen Effekt. Der Einfluss von SHAM ist in Abb. 6.3B nicht sonderlich ausgeprägt, was auch durch die nicht-signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und SHAM in Abb. 6.6 deutlich wird. Abbildung 6.3B zeigt die Besonderheit, dass die Antimycin-Kurve oberhalb der Kontroll-Kurve liegt. Bei Oligomycin ist  $a_3$  verstärkt, was den Abfall in  $a_2$  überkompensiert (Abb. 6.6).

## 6.5 Diskussion

Hansen et al. (1991) haben aus einem einfachen Modell lineare Gleichungen hergeleitet, welche das kinetische Verhalten für die Entladung des PQ-Pools und des PSI-Akzeptor-Pools beschreiben. Die resultierenden Zeitkonstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  berechnen sich dann wie folgt:

$$\frac{1}{\tau_{2,3}} = \frac{k_{\text{PX}} + k_{\text{X}}}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{k_{\text{PX}} + k_{\text{X}}}{2}\right)^2 + k_{\text{XP}}k_{\text{PX}}} \quad (6.2)$$

Dabei ist  $k_{\text{PX}}$  die Ratenkonstante des ETC-Flusses von PQ zu X, dem Pool der PS-I-Akzeptoren;  $k_{\text{XP}}$  ist der inverse Fluss und  $k_{\text{X}}$  der Fluss aus dem PS-I-Akzeptorpool heraus.

In Gleichung 6.2 ist ersichtlich, dass es keine einfache inverse Beziehung zwischen den Ratenkonstanten der Entladung des einzelnen Pools und den gemessenen Zeitkonstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  gibt, denn diese Zeitkonstanten sind gekoppelt. Deshalb beeinflusst eine Veränderung der Entlade-Ratenkonstante des PS-I-Akzeptorpools nicht nur  $\tau_3$ , sondern auch  $\tau_2$ . Diese Kopplung zwischen  $\tau_2$  und  $\tau_3$  wird sogar noch stärker, wenn ein komplizierteres Modell, das z. B. den zyklischen Fluss um PS I berücksichtigt, angenommen wird. Dennoch ist bereits nur aufgrund der Gleichung 6.2 die Zuordnung der in Tabelle 6.1 und in den Abbildungen 6.5 und 6.6 gefundenen Änderungen schwierig. Aus dieser Gleichung ergibt sich, dass beide Zeitkonstanten für kleine Werte von  $k_{\text{X}}$  ansteigen.  $k_{\text{X}}$  beschreibt die Reaktionen, die zu einer Entladung des PS-I-Pools führen.

Das Verhalten von  $a_2$ ,  $\tau_2$ ,  $a_3$  und  $\tau_3$  in Abb. 6.5B,D erscheint einfach zu interpretieren in der Phase zwischen 50 und 140 s, also im Bereich der Induktionskurve der Photosynthese: Zu Beginn der Beleuchtungsphase mit aktinischem Licht können kleine Werte von  $k_{\text{X}}$  in Gleichung 6.2 erklärt werden mit der Verzögerung durch die lichtinduzierte Aktivierung der Enzyme des Calvin-Zyklus (Wedel et al., 1997). Kleine Werte der Ratenkonstante  $k_{\text{X}}$  der PS-I-Entladung führen zu langsamen Zeitkonstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  sowie großen Werten für  $a_2$  und  $a_3$  (Hansen et al., 1991). Dann wird der Pool auf einen hohen Level während des sättigenden Blitzes aufgefüllt. Dieser hohe Füllstand führt zu einem großen Wert der Amplitudenfaktoren  $a_2$  und  $a_3$ . Mit steigender Aktivierung des Calvin-Zyklus sinken die vom Blitz aufgeladenen Pool-Level hingegen wieder. Die Zeitkonstanten werden schneller und erreichen minimale Werte oder ein Plateau bei 140 s.

Aufwendiger hingegen ist die Erklärung des Verhaltens während der Phase der  $\text{CO}_2$ -Verarmung, welche bei ungefähr 150 s beginnt. Es treten nicht so dramatische Effekte bei den Zeitkonstanten auf. Das deutet an, dass ein anderer Mechanismus ins Spiel kommt, der Elektronen aus der ETC übernimmt. Dieser Unterschied wird bereits bei der Betrachtung des Gesamtflusses  $J$  deutlich: Während der Induktionsphase der Enzyme des Calvin-Zyklus bei 50–150 s (Abb. 6.5A) steigt  $J$  parallel zur Verfügbarkeit von PS-I-Akzeptoren. Dies führt zu einem Abfall von  $a_2$ ,  $\tau_2$  und  $\tau_3$  in Abb. 6.5B,D. Während der  $\text{CO}_2$ -Verarmung findet keine Abnahme des Flusses  $J$  statt, wie bereits bei Schinner et al. (2001b) gefunden. Es gibt aber eine dramatische Veränderung in  $a_2$  (Abb. 6.5D), welche den Großteil der Änderungen in  $J_{\text{R,rel}}$  in Abb. 6.5C verursacht.

Die Suche nach möglichen Mechanismen für diesen Anstieg von  $a_2$ , welcher mit einem konstanten Exzitonenfluss  $J$  unter  $\text{CO}_2$ -Verarmung einher geht (Abb. 6.5A), führt auf die folgende Fallunterscheidung:

1. Es wird angenommen, dass alle Ratenkonstanten der ETC die gleichen sind unter aktinischem Licht und unter sättigenden Blitzen. Dann muss gefolgert werden, dass die  $\text{CO}_2$ -Verarmung die Ratenkonstante der PS-I-Entladung geändert hat, aber der Fluss  $J$  bleibt gleich. Hier ist auf einen höheren Grad an Reduktion der Pools zu schließen, insbesondere des PQ-Pools, was durch einen höheren Wert von  $a_2$  angezeigt wird.
2. Es kann aber auch angenommen werden, dass die Abnahme des Flusses in den Calvin-Zyklus komplett zu einem anderen Redox-Akzeptor umgeleitet wird. Dieser zusätzliche Weg wird aber während des Blitzes gesättigt. Dies würde den unveränderten Fluss  $J$

unter aktinischem Licht ebenso erklären wie die Zunahme des durch  $a_2$  angezeigten Redox-Niveaus unter sättigenden Bedingungen.

3. Die Einbeziehung eines zusätzlichen Akzeptors für die PS-I-Elektronen kann möglicherweise an eine Zunahme des zyklischen Transportes (Scheller, 1996; Joët et al., 2001, 2002; Munekage et al., 2002) während des Blitzes gekoppelt sein, welcher die Entladung des PQ-Pools verhindern und damit  $a_2$  erhöhen würde.

Stoffwechsel-Inhibitoren (Abb. 6.3 und 6.6) stören den Elektronenfluss aus dem Akzeptorpool von PS I hinaus, weshalb der Reduktionsgrad dieses Pools einen höheren Level erreicht. Dies findet sich für  $a_2$  und  $a_3$  im Falle von Glycerinaldehyd, welches die RubisCO inhibiert. Aber im Gegensatz zur  $\text{CO}_2$ -Verarmung ist hier der Haupteffekt bei  $a_3$ . Die Zeitkonstante  $\tau_2$  ist angewachsen wie bei  $\tau_2$  in Abbildung 6.5B. Aber in dieser Abbildung kann der Anstieg von  $\tau_2$  vom Verschwinden der  $\tau_3$ -Komponente herrühren, wobei diese langsame Komponente unter Glycerinaldehyd sogar verstärkt ist. Vermutlich unterscheidet sich das Umschalten auf Photorespiration unter  $\text{CO}_2$ -Mangel von der Wirkung von Glycerinaldehyd. Der Effekt von Oligomycin zeigt an, dass der Export an die Mitochondrien eine Rolle spielt, was auch bei Igamberdiev et al. (1998), Padmasree und Raghavendra (1999b) und Guo et al. (2005) deutlich wird. Eine weitere kleine Unterstützung für diese Befunde liefert der Effekt von SHAM (einem Inhibitor der mitochondrialen AOX) in Abb. 6.6. Aber dieser Unterschied ist nicht sonderlich ausgeprägt.

Oben war der zyklische Transport um PS I als mögliche Erklärung für den Anstieg von  $a_2$  unter  $\text{CO}_2$ -Mangel in Erwägung gezogen worden (Abb. 6.5D). In Abbildung 6.3B verursacht Antimycin eine schnellere Entladung der Rückstellflanke als unter Kontroll-Bedingungen. Dies zeigt sich auch in  $a_2$  und  $a_3$  in Abb. 6.6. Da der Effekt von Antimycin das Gegenteil von dem von Oligomycin und SHAM ist, kann die Auswirkung auf den mitochondrialen Elektronentransport nur eine geringe Rolle spielen. Stattdessen würde tatsächlich eine Inhibition des zyklischen Transportes die Wiederaufladung des PQ-Pools und damit dessen Entladung verhindern.

## 6.6 Zusammenfassung

Die langsame Komponente der Blitzrückstellflanken nach sättigenden Blitzen kann verwendet werden, um das Verhalten des PS-I-Akzeptor-Pools und des Plastoquinon-Pools zu untersuchen. Die Ergebnisse in diesem Kapitel (besonders der Effekt von Oligomycin) unterstützt die Ergebnisse früherer Studien (Gardeström, 1996; Igamberdiev et al., 1998, 2001; Padmasree und Raghavendra, 1999b, 2001; Guo et al., 2005), dass der Export an die Mitochondrien eine starke Rolle spielt als Senke für Redox-Äquivalente von PS I. Untersuchungen der Rückstellflanken bieten eine Methode um zu zeigen, dass Antimycin auf den zyklischen Transport wirkt, da die Effekte anders sind als die von Oligomycin.

## Kapitel 7

# Anwendung der Analyse der Blitzrückstellflanken auf infizierte Pflanzen

Im Kapitel 6 wurde gezeigt, dass die Analyse der langsamen Komponente der Rückstellflanken nach sättigenden Blitzen ein Werkzeug darstellt, das das Studium des PS I-Akzeptor- und PQ-Pools erlaubt. Da eine Pilzinfektion auch Auswirkungen auf diese Pools haben sollte (siehe Kapitel 10), wird in diesem Kapitel das Verfahren auf gesunde und infizierte Weizenblätter angewandt.

### 7.1 Mess- und Infektionsverfahren

Weizenblätter wurden wie im Abschnitt 4.2.3 (S. 29) beschrieben mit *Septoria tritici* oder *Septoria nodorum* infiziert und dann mit den im Abschnitt 6.1 genannten Inhibitoren vergiftet.

Alle Blitzantworten sind dergestalt normiert (Funktion  $x_{norm} = ax_{mess} + b$ ), dass die Kurven vor und während des Blitzes übereinander liegen, da nur die relativen Änderungen während der Rückstellung von Interesse sind. Alle weiter hinten gezeigte Antworten sind jeweils Ausschnittvergrößerungen, die dort beginnen, wo die Rückstellflanke auf 30-40% des Gesamtausschlages zurückgegangen ist.

Da in diesem Kapitel auch Messungen durchgeführt wurden, bei denen zusätzliches Fernrotlicht (für die selektive Anregung von PS I) gegeben wurde, kam ein erweitertes Messprotokoll zum Einsatz:

10 Minuten Dunkeladaption,

10 Minuten Messung bei Low-Light (LL=290  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),

5 Minuten Dunkeladaption,

10 Minuten Messung bei High-Light (HL=700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),

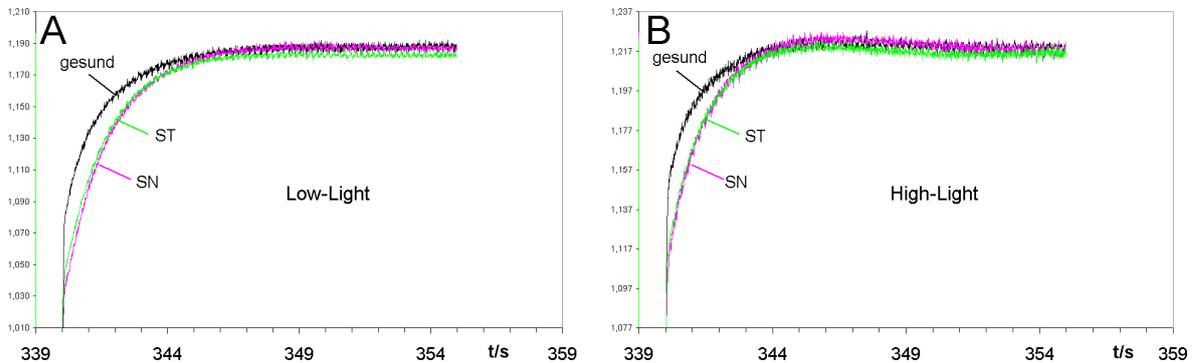
Einschaltung des FR-Lichtes und 5 Minuten Dunkeladaption,

10 Minuten Messung bei Low-Light (LL=290  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mit FR),

5 Minuten Dunkeladaption,

10 Minuten Messung bei High-Light (HL=700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  mit FR).

## 7.2 Rückstellflanken bei gesunden und infizierten Pflanzen ohne Stoffwechselgifte



**Abbildung 7.1:** Vergleich der Rückstellflanken nach einem Blitz bei gesunden (jeweils oberste Kurve) mit infizierten (*S. tritici* und *S. nodorum*) Weizenblättern (an der Pflanze). Die Abbildung beginnt an der Stelle, bei der die Blitzantwort von 100% auf 40% abgefallen ist. Lichtprogramm: (A) Low-Light ( $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (B) High-Light ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Mittelung aus jeweils vier Messungen.

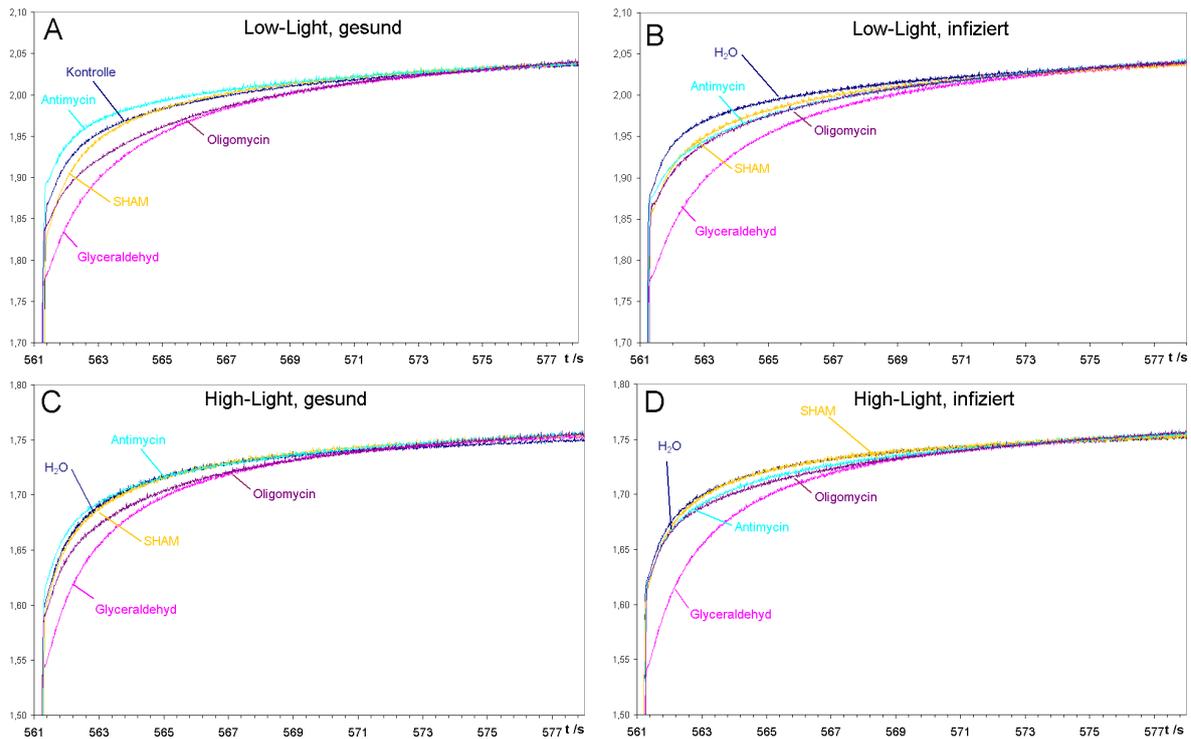
Abb. 7.1 zeigt, dass die Rückstellflanken bei infizierten Pflanzen stets unterhalb der Rückstellflanken der gesunden liegen. Das bedeutet, dass die Entladung des PQ-Pools bei den infizierten Pflanzen geringfügig langsamer geschieht. Ein Einfluss der Hintergrundbeleuchtung mit FR oder der Intensität der Beleuchtung auf diesen Effekt ist nicht signifikant. Diese etwas langsamere Rückstellung passt zu den späteren Schlüssen aus den Frequenzgangmessungen (Abb. 9.1C) und den Gasprungmessungen (Abb. 10.6 und Abb. 10.9), die besagen, dass der Export an die Mitochondrien bei infizierten Pflanzen kleiner ist. Allerdings wird die Aussage überzeugender bei der Betrachtung der Rückstellflanken nach Vergiftung. Deshalb wird hier auf eine genauere Analyse verzichtet.

## 7.3 Blitzflanken bei Infektion mit Stoffwechselgiften

Gesunde und infizierte Weizenblätter wurden wie beschrieben vergiftet und dem im Abschnitt 7.1 genannten Messprotokoll unterworfen. Die Blitzrückstellflanken zeigt Abb. 7.2 für Low- und High-Light. Die Funktion aus Gleichung 6.1 wurde an diese Kurven angefitet wie im Kapitel 6 beschrieben. Tabelle 7.1 zeigt die gemittelten Zeitkonstanten  $\tau_2$  und  $\tau_3$  und die zugehörigen Amplitudenfaktoren  $a_2$  und  $a_3$  zu diesen Messungen nach einer Vorbeleuchtung mit wenig Licht (LL:  $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Die Messwerte zu „gesund“ wurden bereits in Tabelle 6.1 gezeigt. In der Tabelle 7.2 finden sich die zugehörigen Fitparameter für High-Light ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Abb. 7.3 zeigt eine Übersicht der Amplitudenfaktoren.

Die Messungen an gesunden Blättern unter Low-Light (Abb. 7.2A bzw. 7.3 A) sind schon im Kapitel 6 besprochen worden, weshalb hier auf eine Wiederholung verzichtet wird. Bei einer Infektion unter LL (Abb. 7.2B) sind die Unterschiede in den Kurven der Gifte geringer geworden, unterscheiden sich aber noch deutlich von der Wasserkontrolle; nur Glyceraldehyd ist deutlich weiter unterhalb der Kontrollkurve geblieben. Dies ist auch in den Amplitudenfaktoren (Abb. 7.3 B) erkennbar. Hier fällt auch Antimycin noch ein wenig heraus, und dementsprechend ist die Kurve auch etwas flacher.

Bei gesunden Pflanzen unter High-Light verhalten sich die Kurven von Glyceraldehyd und Oligomycin ähnlich (Abb. 7.2C) wie unter LL; SHAM hat sich der Kontrolle stark angenähert, und Antimycin hat seine Sonderstellung verloren und ist kaum noch von Wasser zu unterschei-



**Abbildung 7.2:** Giftwirkung auf die Blitzrückstellflanken nach Beleuchtung, gemessen mit dem Lichtprogramm nach Messprogramm aus Abschnitt 7.1. Es wurden pro Kurve Messungen von 4–10 Weizenblättern gemittelt. Vorbeleuchtung mit (A, B) Low-Light:  $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , (C, D) HL:  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A, C) gesunde Blätter, (B, D) mit *Septoria tritici* infiziert.

den. Bei den Amplitudenfaktoren (Abb. 7.3 B) fallen nur noch Glycerinaldehyd und Oligomycin auf.

Bei den Kurven der infizierten Pflanzen unter High-Light (Abb. 7.2D) fallen nun alle Gifte bis auf Glycerinaldehyd nahezu mit der Kontrolle zusammen. Bei den  $a_i$  (Abb. 7.3 D) sieht man dementsprechend auch keine signifikanten Unterschiede mehr bis auf den von Glycerinaldehyd.

Dieser Inhibitor bremst also auch hier in allen Fällen die Entladung der Pools. Da unter diesen Bedingungen (HL und infiziert) die mitochondrialen Gifte keine Wirkung mehr zu haben scheinen, ist offensichtlich der Export an die Mitochondrien heruntergefahren.

**Tabelle 7.1:** Ergebnisse der Fits der langsamen Komponente der Blitz-Rückstellflanken nach Low-Light ( $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) mit der Gleichung 6.1. Mittelwerte über 4–5 Blätter pro Behandlung. Die Messwerte zu „gesund“ wurden bereits in Tabelle 6.1 gezeigt.

gesund	$\tau_2 / \text{s}$	$\tau_3 / \text{s}$	$a_2$	$a_3$
Kontrolle	1,0	8,7	-92 $\pm$ 27	-99 $\pm$ 30
Glyceraldehyd	1,46	5,7	-151 $\pm$ 74	-171 $\pm$ 97
SHAM	0,78	5,7	-118 $\pm$ 36	-113 $\pm$ 95
Antimycin A	0,90	9,5	-85 $\pm$ 28	-86 $\pm$ 49
Oligomycin	0,85	6,7	-66 $\pm$ 56	-158 $\pm$ 60

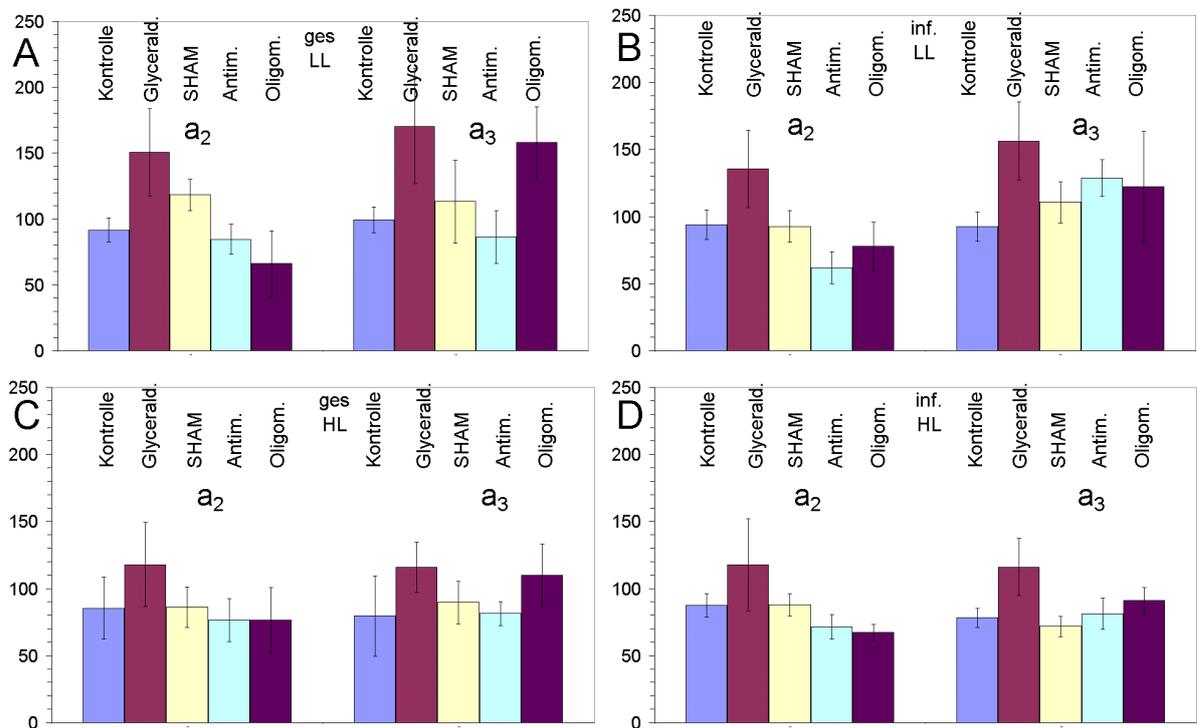
Inf ST	$\tau_2 / \text{s}$	$\tau_3 / \text{s}$	$a_2$	$a_3$
Kontrolle	0,63	7,1	-94 $\pm$ 35	-93 $\pm$ 35
Glyceraldehyd	1,3	6,7	-135 $\pm$ 92	-156 $\pm$ 92
SHAM	0,77	6,5	-93 $\pm$ 37	-111 $\pm$ 48
Antimycin A	0,86	7,7	-62 $\pm$ 37	-129 $\pm$ 43
Oligomycin	1,2	8,3	-78 $\pm$ 51	-122 $\pm$ 117

**Tabelle 7.2:** Ergebnisse der Fits der langsamen Komponente der Blitz-Rückstellflanken nach High-Light ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) mit der Gleichung 6.1. Mittelwerte über 4–5 Blätter pro Behandlung.

gesund	$\tau_2 / \text{s}$	$\tau_3 / \text{s}$	$a_2$	$a_3$
Kontrolle	0,70	4,4	-85 $\pm$ 66	-80 $\pm$ 85
Glyceraldehyd	1,1	5,2	-118 $\pm$ 99	-116 $\pm$ 60
SHAM	0,65	4,9	-86 $\pm$ 48	-90 $\pm$ 50
Antimycin A	0,64	6,3	-76 $\pm$ 45	-81 $\pm$ 25
Oligomycin	0,70	5,8	-76 $\pm$ 69	-110 $\pm$ 66

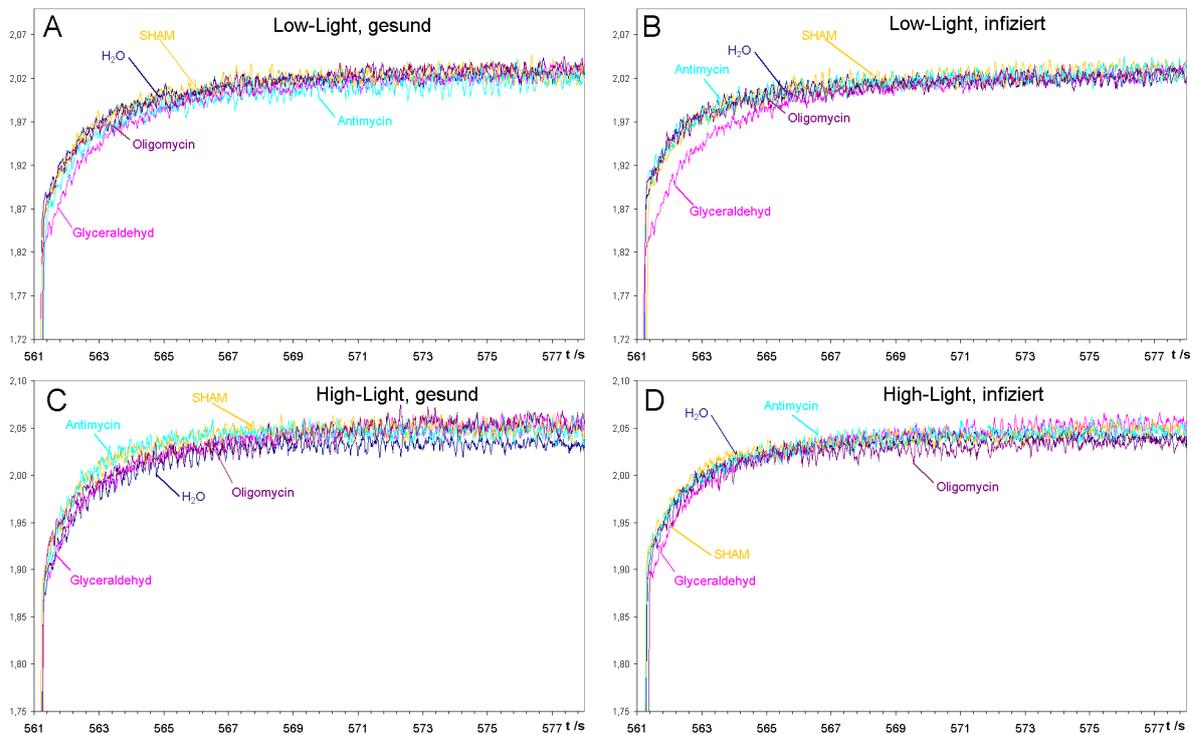
  

Inf ST	$\tau_2 / \text{s}$	$\tau_3 / \text{s}$	$a_2$	$a_3$
Kontrolle	0,72	4,6	-87 $\pm$ 27	-78 $\pm$ 22
Glyceraldehyd	1,1	5,2	-118 $\pm$ 109	-116 $\pm$ 67
SHAM	0,69	5,1	-88 $\pm$ 27	-72 $\pm$ 23
Antimycin A	0,74	6,9	-72 $\pm$ 29	-81 $\pm$ 37
Oligomycin	0,62	7,4	-67 $\pm$ 19	-91 $\pm$ 31



**Abbildung 7.3:** Amplitudenfaktoren  $a_2$  und  $a_3$  aus den Fits der Kurven aus Abb. 7.2, welche auch in den Tabellen 7.1 und 7.2 zu finden sind. Erläuterung zu Mittelung und Fehlerbalken finden sich im Abschnitt 6.4.2. (A, B) Low-Light:  $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , (C, D) HL:  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A, C) gesunde Blätter, (B, D) mit *Septoria tritici* infiziert.

## 7.4 Blitzrückstellflanken bei Infektion mit Stoffwechselgiften mit Fernrot-Licht



**Abbildung 7.4:** Giftwirkung auf die Blitzrückstellflanken mit FR-Hintergrundlicht und nach Beleuchtung, gemessen mit dem Lichtprogramm nach Messprogramm aus Abschnitt 7.1. Es wurden pro Kurve Messungen von 10-20 Weizenblättern gemittelt. Vorbeleuchtung mit (A, B) Low-Light:  $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , (C, D) HL:  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A, C) gesunde Blätter, (B,D) mit *Septoria tritici* infiziert.

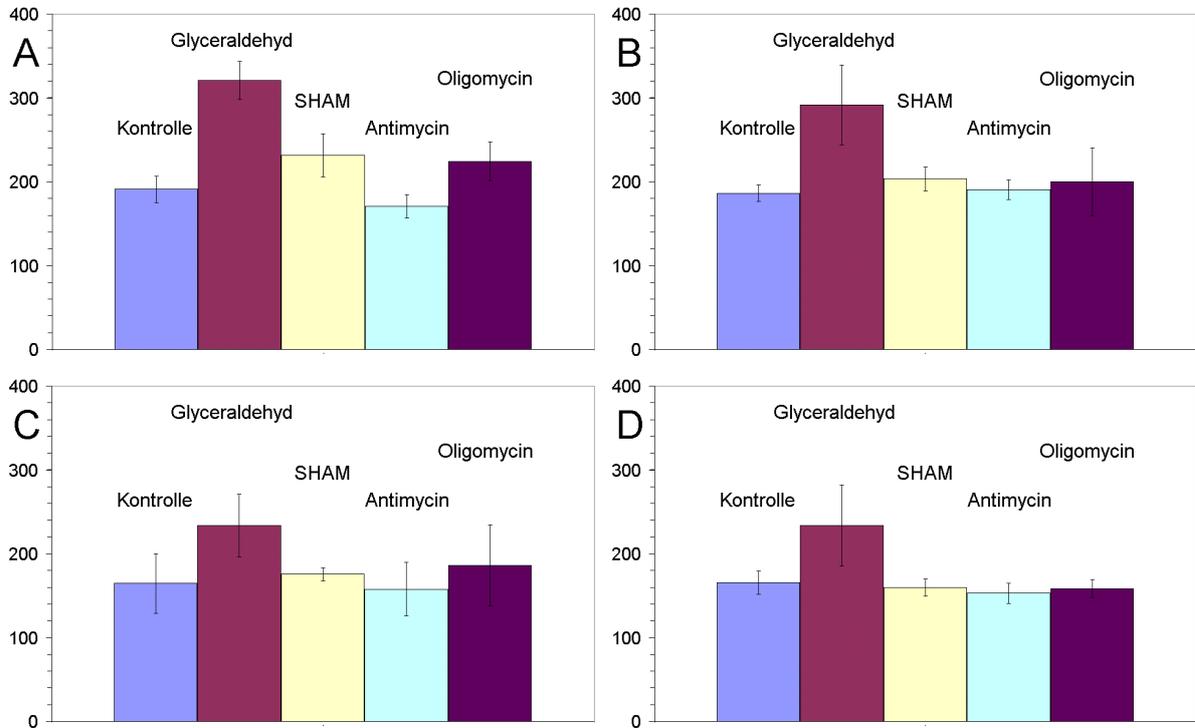
Die Messungen der Abb. 7.2 wurden auch in Gegenwart eines schwachen FR-Lichtes ( $0,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wiederholt und sind in Abb. 7.4 gezeigt. Es ist deutlich erkennbar, dass das Rauschen stark zugenommen hat. Dies liegt daran, dass das Fernrot-Licht durch das RG9-Filter des Detektors durchgeht (siehe Abschnitt 4.5.1) und deshalb von der FC-Maschine weggeregelt werden muss. Dies führt bei dem im Vergleich zur Fluoreszenz hellen FR-Licht zu starkem Rauschen.

Deshalb sind die Unterschiede zwischen den verschiedenen Giften aus Abb. 7.2 nun in 7.4 weitestgehend im Rauschen verschwunden. Nur Glyceraldehyd zeigt unter Low-Light (7.4A,B) noch die gleichen Unterschiede: Die Kurve liegt deutlich unter den anderen. Unter High-Light und Infektion (7.4D) ist dies auch noch leicht erkennbar.

Im Vergleich zu Abb. 7.2 ist jedoch deutlich, dass unter FR-Licht die Wirkung der Inhibitoren vermindert ist. Aufgrund des hohen Rauschens konnte eine Auswertung durch Fitten mit Gleichung 6.1 nicht zum Erfolg führen.

## 7.5 Schlussfolgerungen

Da Fits mit Gleichung 6.1 nicht-orthogonale Exponentialfunktionen benutzen, kann es immer geschehen, dass ein Fehler in der  $\tau_2$ -Komponente durch einen Fehler in der  $\tau_3$ -Komponente ausgeglichen wird. Deshalb sind in Abb. 7.5 die Summen von  $a_2$  und  $a_3$  dargestellt.



**Abbildung 7.5:** Summen der Amplitudenfaktoren  $a_2$  und  $a_3$  aus den Fits der Kurven aus Abb. 7.2 bzw. aus den Tabellen 7.1 und 7.2. Erläuterung zu Mittelung und Fehlerbalken finden sich im Abschnitt 6.4.2. (A, B) Low-Light:  $290 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , (C, D) HL:  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A, C) gesunde Blätter, (B, D) mit *Septoria tritici* infiziert.

Man sieht jetzt Folgendes: Glyceraldehyd bewirkt unter allen Bedingungen eine Vergrößerung der langsamen Phase der Rückstellflanke. Die Wirkung von SHAM wird bei infizierten Pflanzen schwächer, die von Oligomycin verschwindet unter High-Light-Bedingungen. Diese Aussage deckt sich mit dem Eindruck aus Abb. 7.3 und Abb. 7.2. Es lässt sich also feststellen, dass bei Infektion der Redox-Export in die Mitochondrien entweder eine geringere Rolle spielt oder unter High-Light schneller gesättigt wird als bei gesunden Pflanzen.



# Kapitel 8

## Antworten auf Fernrot

Als Fernziel wird der Einsatz der Chlorophyll-Fluoreszenz zur Pathogendetektion angestrebt. Die obigen Versuche haben gezeigt, dass zwar Unterschiede in der Chl-Fluoreszenz im Kapitel 5 und in den Blitzrückstellflanken (Abb. 7.1) zu sehen waren. Doch die Unterschiede waren nicht sehr groß, so dass die Erwartung, dass diese Unterschiede nicht von abiotischen Stresseffekten überdeckt werden, gedämpft ist.

Deshalb werden hier Antworten auf Fernrot-Licht untersucht, welches hauptsächlich das Photosystem I anregt. Es wird gehofft, dass pilz-induzierte Elektronenfluss-Verzweigungen sich hier am deutlichsten abzeichnen.

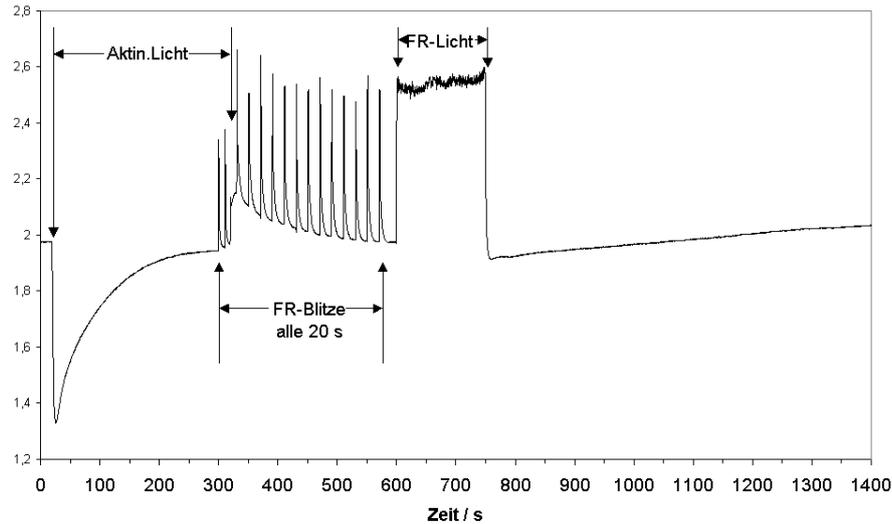
### 8.1 Messprogramm

Als mögliche Fernrot-Lichtsignale bieten sich Blitze und Ein- und Ausschaltkinetiken an. In einem kombinierten Messprogramm ist es möglich, diese hintereinander am selben Blatt zu messen. Das Lichtprogramm dazu zeigt Tabelle 8.1. Eine Beispielmessung mit eingezeichnetem Lichtprogramm zeigt die Abbildung 8.1.

**Tabelle 8.1:** Messprogramme für Blitz- und Schaltkinetikmessungen mit Fernrot-Licht

Messung	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5
Funktion	Low-Light kurz	Low-Light lang	High-Light kurz	High-Light mittel	High-Light lang
Aktin.Licht an	20 s	20 s	20 s	20 s	20 s
Start FR-Blitze	300 s	900 s	300 s	600 s	900 s
Aktin.Licht aus	320 s	920 s	320 s	620 s	920 s
Ende FR-Blitze	580 s	1180 s	580 s	880 s	1180 s
FR-Licht an	600 s	1200 s	600 s	900 s	1200 s
FR-Licht aus	750 s	1350 s	750 s	1050 s	1350 s

Da neben anderen Parametern in diesem Falle weder die optimale Dauer des aktinischen Lichtes noch dessen Intensität bekannt war, wurden diese variiert: Low-Light ( $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und High-Light ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wurden verschieden lang eingeschaltet, wobei alle anderen Zeiten (FR-Blitz- FR-Lichtphase) konstant gelassen wurden. So ergaben sich die in der Tabelle 8.1 angegebenen fünf verschiedenen Messprogramme, die hintereinander weg am selben Blatt gemessen wurden.



**Abbildung 8.1:** Beispielmessung für die Erfassung von FC-Antworten auf FR-Blitze und Ein- und Ausschaltkinetiken mit dem Messprogramm aus Tabelle 8.1. Gezeigt ist das Ergebnis von „Messung 1“: Aktinisches Licht ( $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) von 20 bis 320 s, Fernrot-Blitze von 300 bis 580 s und Fernrot-Dauerlicht von 600 bis 750 s. Intensität FR-Licht:  $6,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## 8.2 Auswertung und Optimierung der Lichtparameter

### 8.2.1 Ermittlung der Messwerte

Aus den Messungen mit dem Lichtprogramm aus Tabelle 8.1 wurden nun die folgenden interessante Bereiche ausgewählt (Die Auswahl der hier genannten Bilder in Abb. 8.2 wird später bei den Optimierungen erläutert.):

**FR-Blitz Anfang:** FR-Blitz zu Beginn der Blitzphase direkt nach dem Ausschalten des aktinischen Lichtes. In der „Messung 1“ (nach Tab. 8.1) ist dies der Bereich von 325 bis 348 s. Für die Messungen 2, 4 und 5 gelten entsprechend andere Zeiten. In Abbildung 8.2A ist ein solcher Blitz für eine „Messung 4“ gezeigt (625 bis 648 s).

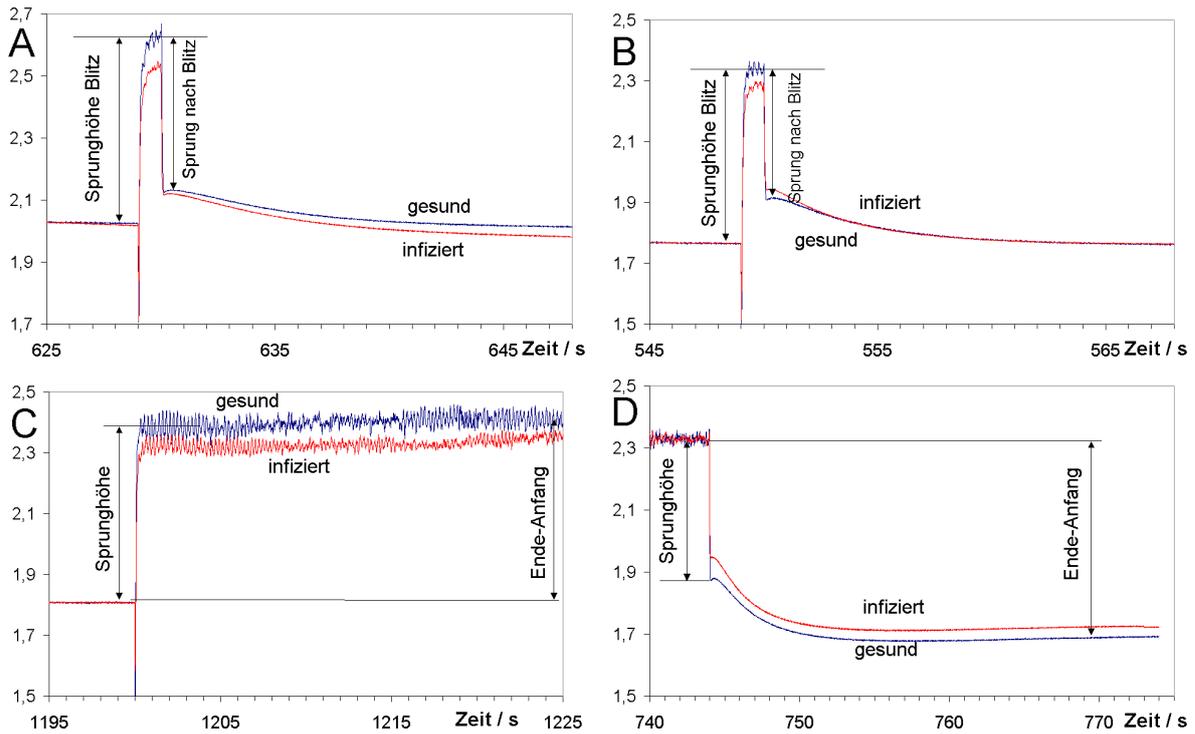
**FR-Blitz Ende:** FR-Blitz am Ende der Blitzphase. Für „Messung 1“ (nach Tab. 8.1) ist dies der Bereich 545 bis 548 s, wie in der Abbildung 8.2B gezeigt, für die anderen Messprogramme gelten entsprechende Zeiten.

**FR-Licht an :** Einschalten des Fernrot-Lichtes (für 150 s und nicht nur die eine Sekunde bei einem Blitz). Für „Messung 1“ (nach Tab. 8.1) der Bereich 590 bis 625 s. Abb. 8.2C zeigt einen solchen Ausschnitt für „Messung 2“ im Bereich von 1190 bis 1255 s.

**FR-Licht aus :** Ausschalten des Fernrot-Lichtes. Für „Messung 1“ ist dies die Zeit von 740 bis 774 s, wie in Abb. 8.2D gezeigt.

Diese Bereiche wurden aus allen Messungen entsprechend ausgeschnitten, sortiert und auf den Fluoreszenzwert zu Beginn normiert. Dann wurde für die Punkte zu jedem Zeitpunkt jeweils ein Mittelwert errechnet. So ergaben sich Mittelwertkurven wie in der Abbildung 8.2 gezeigt.

Zur weiteren Auswertung wurden nun an bestimmten Punkten in den Messungen die jeweiligen Fluoreszenzwerte ermittelt und daraus die wie folgt beschriebenen Parameter berechnet (diese sind in der Abbildung 8.2 eingezeichnet):



**Abbildung 8.2:** Messung der FC-Antworten auf verschiedene FR-Lichter gemäß Messprogramm aus Tabelle 8.1 mit gesundem und mit *Septoria tritici* infiziertem Weizen. Die Kurven zeigen jeweils die Mittelwerte über 35-40 (gesund) bzw. 65-70 (infiziert) Messungen. Eingezeichnet sind ferner die für die Auswertung erfassten Größen aus Gleichung 8.1 bis 8.6. Die Zeiten auf der x-Achse sind die Originalmesszeiten. (A) FR-Blitz am Anfang der Blitzphase gemäß Programm „Messung 4“ (Tab. 8.1): Aktinisches Licht ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) von 20-620 s. (B) FR-Blitze am Ende der Blitzphase (Programm „Messung 1“): Akt.Licht ( $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) von 20-320 s. (C) FR-Licht an (nach Programm „Messung 2“): Aktinisches Licht mit  $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  von 20-920 s. (D) FR-Licht aus (nach „Messung 1“): Aktin.Licht ( $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) von 20-320 s. Die Auswahl der hier gezeigten Messprogramme ergibt weiter unten aus der Parameter-Optimierung.

**FR-Blitz Anfang:** Werte kurz vor Beginn des FR-Blitzes ( $B_0$ ), kurz vor dessen Ende ( $B$ ) und kurz nach dem Blitzende ( $B_E$ ). Daraus berechnet:

$$\text{Sprunghöhe Blitz} = B - B_0 \quad (8.1)$$

$$\text{Sprunghöhe nach Blitz} = B - B_E \quad (8.2)$$

**FR-Blitz Ende:** genauso wie bei „Anfang“

**FR-Licht an :** Wert kurz vor Einschalten ( $A$ ), einer kurz danach ( $B$ ) und einer am Ende des Ausschnitts ( $C$ ). Daraus:

$$\text{Sprunghöhe} = B - A \quad (8.3)$$

$$\text{Ende} - \text{Anfang} = C - A \quad (8.4)$$

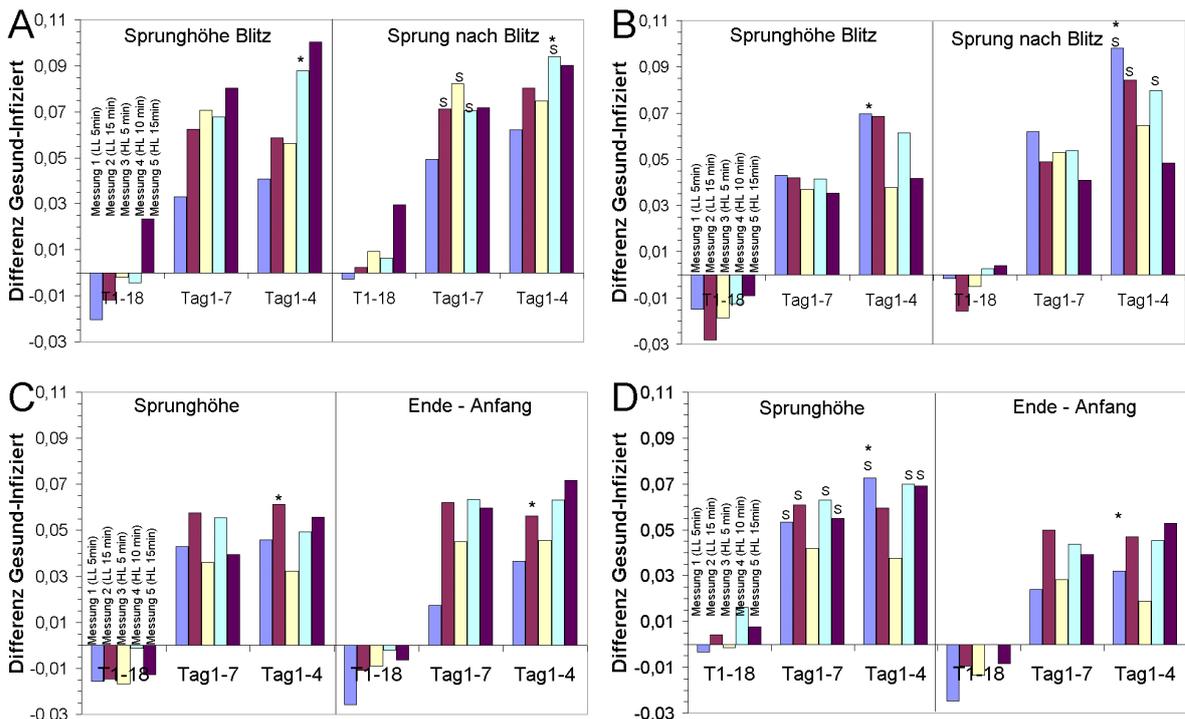
**FR-Licht aus :** Wertermittlung analog zu „FR-Licht an“. Berechnung:

$$\text{Sprunghöhe} = A - B \quad (8.5)$$

$$\text{Ende} - \text{Anfang} = A - C \quad (8.6)$$

Die so erhaltenen Werte für jede Messung wurden sortiert und gemittelt.

Da das Fernziel der Untersuchung die Unterscheidung von gesunden und infizierten Pflanzen ist, wurden die Differenzen bei den so erhaltenen Werten zwischen diesen beiden Gruppen gebildet und die Ergebnisse in Abbildung 8.3 dargestellt. Hierbei wurde zusätzlich unterschieden, wie lange die Infektion schon her war. Die mit *Tag1-4* bezeichneten Messungen beinhalten diejenigen, die am ersten bis vierten Tag nach der Infektion gemacht wurden, bei *Tag1-7* sind dies entsprechend mehr bis zum siebenten Tag, und schließlich bezeichnet *Tag1-18* alle durchgeführten Messungen bis hin zum 18. Tag nach Infektion. Die Gruppierung erfolgte hier immer mit dem ersten Tag beginnend, da auf dem Feld damit zu rechnen ist, dass man ein Gemisch aus verschiedenen Infektionsstadien vorfindet, über das dann dort auch gemittelt werden würde.



**Abbildung 8.3:** Differenzen gesund-infiziert bei Messung der FC-Antworten auf verschiedene FR-Lichter gemäß Messprogramm aus Tabelle 8.1 mit gesundem und mit *Septoria tritici* infiziertem Weizen. Programm „Messung 1“: Low-Light ( $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) für 5 min, „2“: LL für 15 min, „3“: High-Light ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) für 5 min, „4“: HL für 10 min, „5“: HL für 15 min. x-Achse: Tag1-4: nur Messungen am ersten bis vierten Tag nach Infektion, Tag1-7: entsprechend erster bis siebenter Tag, T1-18: bis zum 18. Tag nach Infektion (Alle Messungen). „\*“ bezeichnet solche Messungen, die in Abbildung 8.2 dargestellt sind und die weiter in Abb. 8.4 ausgewertet wurden. „S“ kennzeichnet solche Messungen, die im Abschnitt 8.3 signifikant wurden. Details und Ermittlung der dargestellten Werte siehe Text. (A) FR-Blitz am Anfang der Blitzphase, (B) FR-Blitze am Ende der Blitzphase, (C) FR-Licht an, (D) FR-Licht aus.

## 8.2.2 Optimierung der Licht- und Infektionsparameter

Wie in der Abbildung 8.3 erkennbar ist, hat sowohl die Wahl des Messprogrammes gemäß Tabelle 8.1 als auch die Infektionsphase einen entscheidenden Einfluss nicht nur auf die Quantität, sondern auch auf die Qualität des Ergebnisses.

So ist die Differenz in der Abbildung 8.3A für *FR-Blitze am Anfang der Dunkelphase* für das Signal *Sprunghöhe Blitz* bei Messungen mit dem Programm „Messung 5“ (nach Tabelle 8.1) am größten, also für High-Light-Messungen mit 15 min Belichtungsphase; bei dem Signal

*Sprunghöhe nach Blitz* hingegen liefern eher kürzere Belichtungszeiten mit High-Light größere Differenzen (rechte Säulengruppen in Abb. 8.3A).

Für *FR-Blitze am Anfang der Dunkelphase* (Abb. 8.3B) liefern kurze Belichtungen mit Low-Light größere Differenzen („Messung 1“ und „2“). Bei der Signalphase *FR-Licht an* (Abb. 8.3C) ist das optimale Ergebnis nicht nur von der Wahl des Lichtprogrammes abhängig, sondern auch vom Signal (*Sprunghöhe* bzw. *Ende-Anfang*) und von der Pflanzengruppe (*Tag1-7* bzw. *Tag1-4*). Bei *FR-Licht aus* (Abb. 8.3D) verhält sich dies analog.

## 8.3 Ergebnisse

Die Abbildung 8.3 zeigt deutlich, dass sich zum einen durch die Wahl der richtigen Parameter des Lichtprogrammes die Stärke des gewünschten Signales zur Unterscheidung von gesunden und mit *Septoria tritici* infizierten Weizenpflanzen optimieren lässt, zum anderen wird aber auch klar, dass diese optimalen Parameter nicht für alle erfassten Signale und auch nicht für alle Stadien der Infektion gelten.

### Statistische Absicherung

In der Abbildung 8.3 waren keine Fehlerbalken eingezeichnet, was insofern sinnvoll ist, als bei einer Erfassung vom fahrenden Traktor aus der Detektor auch nur einen Mittelwert über viele Blätter zu sehen bekommt.

Betrachtet man aber auch die einzelnen Messungen, so kann man die entsprechenden Messgrößen aus Abschnitt 8.2.1 auch getrennt gemittelt für gesunde und infizierte Pflanzen (also ohne Differenzbildung) auftragen. Dies ist in der Abbildung 8.4 für je eine Signalart dargestellt.

Mit Hilfe des Statistik-Programmes *SPSS* wurden nun t-Tests gerechnet und zwar immer für zwei zusammengehörige Datenreihen gesund – infiziert unter den verschiedenen Messprogrammen aus Tabelle 8.1 und den vier Signalen aus Abschnitt 8.2.1. Waren bei einem Messwertpaar signifikante Unterschiede festzustellen, so wurde der zugehörige Differenzbalken in der Abbildung 8.3 mit einem „S“ gekennzeichnet.

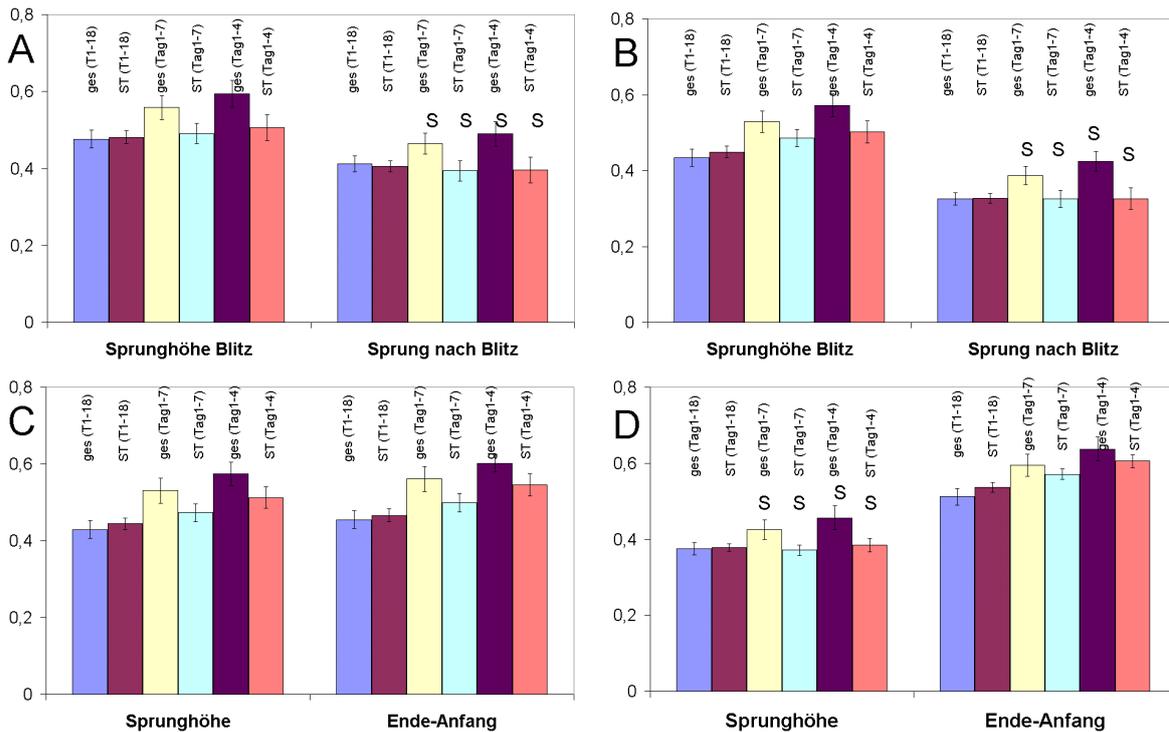
Hier wird deutlich, dass es eher auf die Wahl des Signales ankommt als darauf, welches Messprogramm verwendet wird. So werden bei *FR-Blitz am Anfang* (Abb. 8.3A) in der Säulengruppe *Sprung nach Blitz* für „Tag1–7“ mehr als die Hälfte der Messungen signifikant unterschiedlich, ebenso bei *FR-Blitz am Ende* (Abb. 8.3B) im gleichen Signal für „Tag1–4“. Für *FR-Licht aus* (Abb. 8.3D) finden sich bei *Sprunghöhe Blitz* signifikante Unterschiede sogar bei sieben von zehn Messungen für „Tag1–7“ und „Tag1–7“. Andererseits finden sich weder für das Signal *FR-Licht an* (Abb. 8.3C) noch für jeweils die Mittelwerte über alle Messungen bei allen Signalen irgendwelche Signifikanzen.

### 8.3.1 Verschiedene Phasen der Infektion

Bei einer Infektion mit *Septoria tritici* auf dem Feld werden sicher verschiedene Stadien der Infektion nebeneinander existieren. Die Abbildung 8.3 zeigt hierzu deutlich, dass dies bei einer Detektion Probleme macht, da die Differenz des gezeigten Signales davon abhängt. Die größte Differenz gesund-infiziert ergibt sich für die Tage 1–4 (Abb. 8.3A, B), bei denen nur über die Messungen gemittelt wurden, die bis zum vierten Tag nach der Infektion gemacht wurden, oder für die Tage 1–4 und 1–7 (Abb. 8.3C, D). Die Mittelwerte, die über alle Messungen (bis zu Tag 18 nach Infektion) gerechnet wurden, zeigen keine deutlichen Differenzen, dafür tritt aber ein anderer Effekt auf, nämlich das geänderte Vorzeichen in einigen Fällen: Dort sind die Sprünge bei den infizierten Pflanzen sogar höher.

Auch die statistische Auswertung aus Abschnitt 8.3 bestätigt, dass eine Unterscheidung gesund – infiziert nur in den ersten Tagen nach der Infektion möglich ist.

Eine solche Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand der Messung nach Infektion zeigt sich auch im Kapitel 14 bei der Messung der SHAM-abhängigen Bildung von Reaktivem Sauerstoff (Abb.



**Abbildung 8.4:** Messung der FC-Antworten auf verschiedene FR-Lichter gemäß Messprogramm aus Tabelle 8.1 mit gesundem und mit *Septoria tritici* infiziertem Weizen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte für gesunde und infizierte Blätter für verschiedene Tage nach Infektion (siehe Text). Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Mit „S“ markierte Säulen kennzeichnen signifikante Unterschiede (*t*-Test, 0,06) zwischen den zusammengehörigen Werten für gesunde und infiziert. Details und Ermittlung der dargestellten Werte siehe Text. (A) FR-Blitz am Anfang der Blitzphase mit Programm „Messung 4“ nach Tabelle 8.1, (B) FR-Blitz am Ende der Blitzphase mit „Messung 1“, (C) FR-Licht an mit „Messung 2“, (D) FR-Licht aus mit „Messung 1“.

14.20). Dort ist das Auftreten von Unterschieden zwischen gesunden und infizierten Blättern am Tag drei nach Infektion wieder verschwunden.

## 8.4 Erklärung der unterschiedlichen FR-Wirkung bei gesunden und infizierten Pflanzen

In jeder Reaktionskette gibt es „Rate-Limiting Steps“, d. h., Reaktionsschritte, die den Fluss durch die Gesamtkette begrenzen und damit bestimmen. Im Fall der ETC kann es die Aktivität von PS I sein, die durch die Lichtintensität begrenzt ist, oder die Aufnahmefähigkeit der PS-I-Akzeptoren. Je stärker sich also eine Erhöhung der FR-Intensität auswirkt, um so weniger sind die PS-I-Akzeptoren begrenzend. Die Ergebnisse der Abbildung 8.4 zeigen, dass die „Sprunghöhe nach Blitz“ signifikantere Ergebnisse liefert als die Sprunghöhe selbst. Ebenso ergeben sich signifikante Änderungen nur in den Abschaltvorgängen bei den FR-Antworten in Abb. 8.2D. Hieraus ist zu schließen, dass die Flüsse nach Vorbeleuchtung stärker durch die verschiedene Verfügbarkeit von PS-I-Akzeptoren beeinflusst werden. Es scheint der Effekt vorzuliegen, dass nach Ausschalten des FR-Lichtes die PS-I-Akzeptoren bei infizierten Pflanzen auf einem höheren Redox-Zustand verbleiben, weil der Abfluss geringer war. Etwas Ähnliches trat bei den Giftwirkungen im Kapitel Blitzrückstellflanken auf.

## Kapitel 9

# Hinweise auf zusätzliche PS-I-Akzeptoren neben dem Calvin-Zyklus

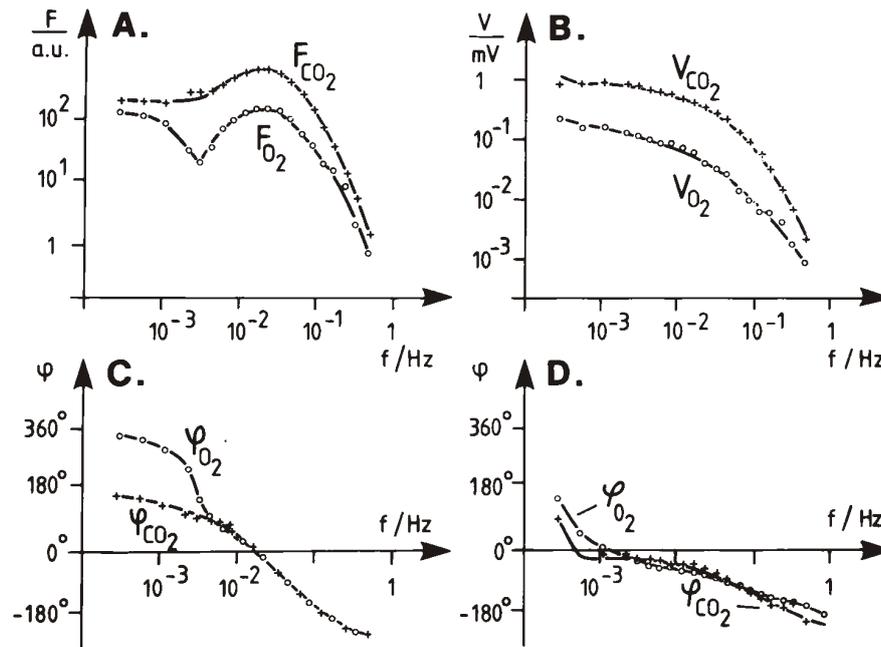
Die vorigen Kapitel verwendeten als Eingangssignal Licht (Aktinisches Licht, Fernrot-Licht und sättigende Blitze). Dabei ergaben sich insbesondere bei den Blitzrückstellflanken Hinweise auf die unterschiedlichen Akzeptoren von PS I. Durch die Veränderung der Gaskonzentrationen kann die Verarbeitung von ATP und Redox-Äquivalenten an der RubisCO, und damit dieser interessante Bereich hinter PS I, ebenfalls beobachtet werden. Dies wird im Folgenden durchgeführt

### 9.1 Ein Hinweis aus der Neuinterpretation alter Daten

Dabei ergibt sich das Problem, dass eine Absenkung der CO<sub>2</sub>-Konzentration durch vermehrte Photorespiration (siehe Abschnitt 3.4) kompensiert wird, welche den Verbrauch übernehmen kann.

Eine häufig benutzte Methode, zwischen Carboxylierung und Oxygenierung der RubisCO zu unterscheiden, ist die Messung unter sogenannten *nicht-photorespiratorischen Bedingungen*, d. h. unter 2 % O<sub>2</sub>, da dann die Photorespiration wegen der Selektivität der RubisCO praktisch nicht mehr läuft. Aber auch die mitochondrialen Prozesse werden bei 2 % O<sub>2</sub> heruntergefahren, so dass die Interpretation nicht eindeutig ist. Eine andere, allerdings aufwändigere Möglichkeit, zwischen diesen Prozessen zu unterscheiden, ergab sich aus einer Beobachtung von Hansen et al. (1993), deren Bedeutung damals aber noch nicht erkannt wurde: Abb. 9.1 zeigt die Frequenzgänge der Wirkung von sinusförmig modulierten CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Konzentrationen auf die Chlorophyll-Fluoreszenz und die simultan gemessene Plasmamembranspannung von Giersch. Im Niederfrequenten haben CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Wirkungen verschiedene Frequenzgänge. Die Kerbe der O<sub>2</sub>-Wirkung bei ca. einer Schwingung pro 300 s in Abb. 9.1 A fällt auf, doch aussagekräftiger sind die unterschiedlichen niederfrequenten Phasensprünge (180° bei CO<sub>2</sub>, 360° bei O<sub>2</sub> in Abb. 9.1 C).

Wäre der Calvin-Zyklus der einzige Akzeptor, hätten die beiden Frequenzgänge sich nur um einen konstanten Faktor unterscheiden dürfen. Sie müssten also die gleiche Form haben, denn der Quotient aus CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Bindung der RubisCO ist konstant und darf nicht von der Frequenz der Gasschwankungen im Minutenbereich abhängen. Es muss also ein langsamer modulierbarer Prozess involviert sein, der eine andere CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Selektivität hat als die RubisCO.



**Abbildung 9.1:** Frequenzganguntersuchungen der Wirkung sinusförmiger  $CO_2$ - oder  $O_2$ -Konzentration auf die Chlorophyll-Fluoreszenz (A, C) und die elektrische Spannung am Plasmalemma (B, D) in *Aegopodium podagraria*. (A, B) Frequenzgang der Amplitude der (A) induzierten Fluoreszenz bzw. (B) Spannungsänderungen an der Plasmamembran (als Maß der Thylakoid-Energetisierung). (C, D) Frequenzgang der Phasenverschiebung der (C) induzierten Fluoreszenz bzw. (D) Spannungsänderungen. Lichtintensität =  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Aus Hansen et al. (1993).

## 9.2 Wiederholung der Frequenzgangmessungen

### 9.2.1 Messaufbau und Ablauf

Die Frequenzgang-Messungen wurden mit dem Gasfluss-Messplatz durchgeführt, der im Abschnitt 4.5.2 (S. 42) beschrieben wurde. Die Erzeugung der sinusförmigen Gasanregung wurde von dem im Abschnitt 4.5.3 beschriebenen Programm durchgeführt, welches auch aus den gemessenen Anregungsantworten die Fourier-Amplitude und die Phase errechnete.

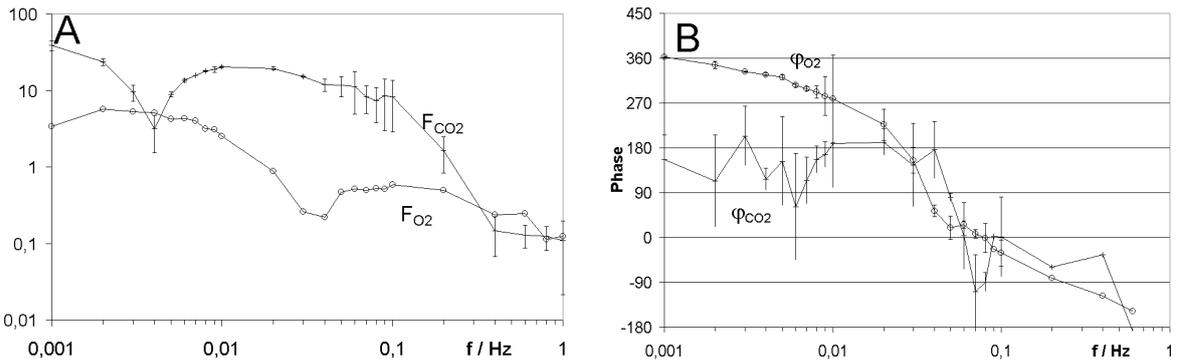
Der Frequenzbereich von  $1-0,001$  Hz wurde in 24 Schritte geteilt mit einer logarithmischen Skala. Für eine Messung bei einer dieser Frequenzen wurde eine entsprechende sinusförmige Gasanregung erzeugt, welche sechs Perioden lang war, von denen nur die letzten drei ausgewertet wurden. So hatte das Blatt genügend Einschwingzeit.

Dazu wurden entweder konstant 4%  $O_2$  und  $CO_2$  moduliert von 150–300 ppm oder konstant 300 ppm  $CO_2$  und  $O_2$  moduliert von 2–8%. Der Stickstoff-Fluss war auf konstant 200 ml/min eingestellt.

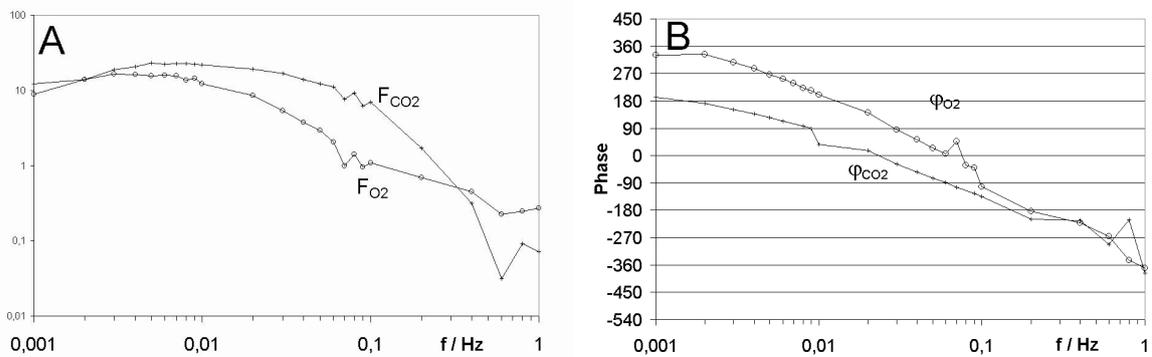
### 9.2.2 Ergebnisse

Da die Frequenzgangmessungen aus Abb. 9.1 weit zurückliegen, ist ihre Gültigkeit noch einmal in neuen Messungen bestätigt worden. Leider lag zu der Zeit kein Weizen vor, so dass auf Giersch zurückgegriffen wurde.

Abb. 9.2 und Abb. 9.3 zeigen verschiedene Typen der Gasantworten als Mittelwerte. Die  $CO_2$ -Antwort ist verhältnismäßig gut reproduzierbar, wenn die Phase als wichtigstes Kriterium genommen wird:  $180^\circ$  im Niederfrequenten,  $0^\circ$  bei ungefähr 0.03 Hz (entspricht ca. 5 s auf der Zeitskala, da  $T = 1/(2\pi f)$ ). Die  $O_2$ -Modulation bewirkt entweder eine zusätzliche Phasen-



**Abbildung 9.2:** Vergleich der Wirkung sinusförmig modulierter  $CO_2$ - (150 bis 300 ppm) oder  $O_2$ -Konzentration (von 2 bis 8 %) auf die (A) Amplitude und (B) Phase der gasinduzierten Änderung der Chlorophyll-Fluoreszenz (FC-Messung). Mittelwerte der Gaskonzentrationen waren:  $CO_2 = 225$  ppm,  $O_2 = 5$  % und Rest  $N_2$ , Gesamtfluss: 210 ml/min, Lichtintensität =  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (nur Messlicht). Mittelwerte über 2–4 Messungen.



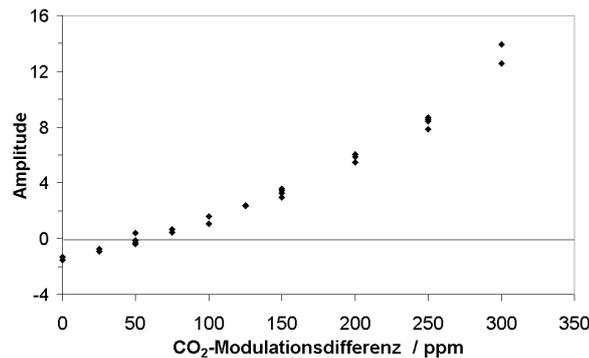
**Abbildung 9.3:** Vergleich der Wirkung sinusförmig modulierter  $CO_2$ - (150 bis 300 ppm) oder  $O_2$ -Konzentration (von 2 bis 8 %) auf die (A) Amplitude und (B) Phase der gasinduzierten Änderung der Chlorophyll-Fluoreszenz (FC-Messung). Mittelwerte der Gaskonzentrationen waren :  $CO_2 = 225$  ppm,  $O_2 = 5$  % und Rest  $N_2$ , Gesamtfluss: 210 ml/min, Lichtintensität =  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Mittelwert über 2–4 Messungen.

drehung von  $180^\circ$  im Niederfrequenten (Abb. 9.1C und 9.2B), oder die Phase ist über einen weiten Frequenzbereich um  $90^\circ$  verschieden (Abb. 9.3B). Beide Typen (Abb. 9.2 und Abb. 9.3) traten unter ähnlichen Bedingungen auf. Die Lichtintensität war zwar unterschiedlich, doch lässt sich dazu keine direkte Korrelation finden. Aus der Verschiedenartigkeit der  $CO_2$ - und  $O_2$ -Frequenzgänge ergibt sich die wichtige Aussage: Es ist nicht nur RubisCO beteiligt.

### 9.3 Hinweis auf die Existenz zusätzlicher Akzeptoren durch Simultanmessung von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>

Ein Argument gegen die Messungen in Abb. 9.1, Abb. 9.2 und Abb. 9.3 könnte sein, dass die CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Frequenzgänge nacheinander im Abstand von 1 bis 2 Tagen (so lange dauerte eine Frequenzgangmessung) aufgenommen wurden. Um diese Bedenken auszuräumen, wurde ein neues Messprotokoll verwendet: CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> wurden simultan mit gleicher Frequenz gegenphasig moduliert. Mit verschiedenen CO<sub>2</sub>-Modulationstiefen wurde der Kompensationspunkt gesucht, bei dem eine CO<sub>2</sub>-Erniedrigung durch eine O<sub>2</sub>-Erhöhung ausgeglichen wurde. Wenn dieser Kompensationspunkt bei verschiedenen Frequenzen der Gasmodulation verschieden liegt, dann ist der Beweis für Mechanismen neben der RubisCO erbracht und auch eine Möglichkeit der messtechnischen Erfassung geschaffen. Im Versuchsaufbau der Abb. 4.13 wurden folgende Messungen durchgeführt: Die O<sub>2</sub>-Konzentration wurde von 2 % bis 8 % sinusförmig moduliert. Dann wurde simultan die CO<sub>2</sub>-Konzentration gegenphasig moduliert, von 300 ppm ausgehend, vermindert auf Stufen von 300 ppm bis 50 ppm.

Abb. 9.4 zeigt den Effekt auf den FC-Fluss für verschiedene Modulationstiefen der CO<sub>2</sub>-Modulation. Es ergibt sich ein Schnittpunkt bei  $\Delta\text{CO}_2$  bei ungefähr 45 ppm. Zum Vergleich werden die bekannten Bindungskonstanten der RubisCO herangezogen:  $K_O = 37826 \text{ Pa}$ ,  $K_C = 28,4 \text{ Pa}$ . Das ergibt einen Selektivitätskoeffizienten von  $S = 3410$ . Bei einer O<sub>2</sub>-Modulation von 2 bis 8 % sollte dann der theoretische Schnittpunkt in Abb. 9.4 bei 17,5 ppm liegen.

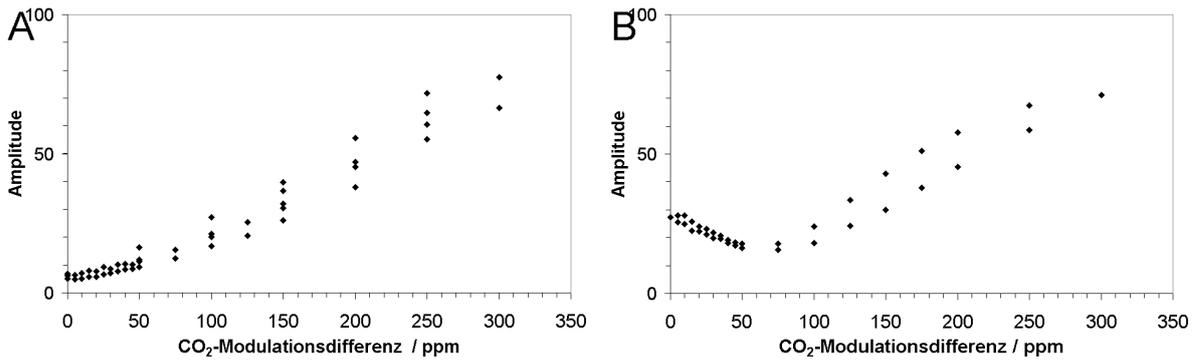


**Abbildung 9.4:** *Wirkung einer gegenphasigen simultanen Modulation der Gaskonzentrationen von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> auf die Exzitonenströme im Photosystem II (FC-Messung). Aufgetragen ist die erste Fourierkomponente (Grundwelle). Lichtintensität:  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Frequenz: 0,01 Hz*

Aber die Messungen ergaben nicht immer Schnittpunkte. Abb. 9.5 zeigt zwei andere Fälle: In 9.5A ergibt sich kein Schnittpunkt, aber man würde einen Schnittpunkt für negative Modulation (das heißt gleichphasig mit O<sub>2</sub>) erwarten. In Abb. 9.5B hingegen entfernt sich die Kurve nach einem Minimum wieder von der x-Achse. Es gibt also gar keinen Schnittpunkt.

Es ergeben sich also folgende Fälle:

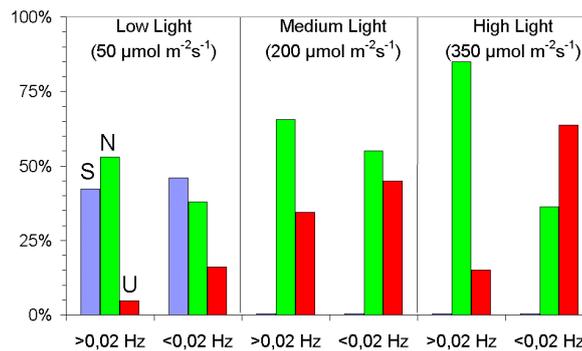
- Abb. 9.4: Schnittpunkt zu positiv,
- Abb. 9.5A: Schnittpunkt zu negativ,
- Abb. 9.5B: Schnittpunkt im Imaginären.



**Abbildung 9.5:** Wirkung einer gegenphasigen simultanen Modulation der Gaskonzentrationen von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> auf die Exzitonenflüsse im Photosystem II (FC-Messung). Lichtintensität: (A) 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bzw. (B) 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Frequenz: 0,01 Hz.

## 9.4 Analyse der unterschiedlichen Kurvenverläufe

Wie die folgenden Messungen zeigen, hängt das Erscheinen der verschiedenen Kompensationstypen nicht nur von der Lichtintensität ab. Abb. 9.6 zeigt eine Übersicht über das Auftreten der verschiedenen Typen, aufgeteilt nach Frequenzbereich (langsamer oder schneller als 1 Schwingung/80 s) und nach Lichtintensität (50, 200, 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



**Abbildung 9.6:** Häufigkeit der Kompensationstypen aus Abb. 9.4 und 9.5 im Niederfrequenten und Hochfrequenten bei verschiedenen Lichtintensitäten. Mit sinusförmiger Gasflussmodulation am Gierschblatt gemessen. O<sub>2</sub>-Modulation: von 2% bis 8%, CO<sub>2</sub>-Modulation: von 300 ppm um 0 bis 250 ppm erniedrigt, 180° phasenverschoben zu O<sub>2</sub>. N<sub>2</sub>-Fluss war jeweils bei 200 ml/min. Es wurde ausgezählt, bei wie vielen Messungen der Fourierkoeffizient der Grundwelle die Achse im Bereich schneidet (Typ „S“, Abb. 9.4), sich ihr nur annähert (Typ „N“, Abb. 9.5A) oder wieder hochgeht (Typ „U“, Abb. 9.5B). Diese Zahlen wurden sortiert nach Lichtintensität (50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und nach Frequenzbereich: Frequenz kleiner oder größer als 0,02 Hz. Die Summe aller drei Fälle wurde jeweils auf 100% normiert.

Man sieht an Abb. 9.6 sehr deutlich, dass der Fall der Abb. 9.4 (Typ „S“, fast nur Beteiligung der RubisCO) nur bei niedrigen Lichtintensitäten auftritt. Je höher die Lichtintensität, um so mehr verhindern Prozesse, die nicht mit der RubisCO zusammenhängen, einen Schnittpunkt. Dies ist bei niedrigen Frequenzen stärker ausgeprägt als bei hohen Frequenzen, das heißt, die Nicht-RubisCO-Prozesse wirken mit langsameren Zeitkonstanten, vielleicht weil weiter entfernte Prozesse wie die in den Mitochondrien beteiligt sind.

Die Bedingungen, unter denen diese verschiedenen Typen auftreten, sind aber wegen der unterschiedlichen Lichtempfindlichkeit nicht unbedingt auf Weizen übertragbar.

## 9.5 Numerische Analyse der unterschiedlichen Kurvenverläufe

Ein Schnittpunkt kann sich nur ergeben, wenn CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>- Wirkung in den Frequenzgängen der Abb. 9.3B die gleiche Phase haben. Wenn ein Phasenunterschied von 180° vorliegt, würde der Fall von Abb. 9.2B vorliegen. Wenn die Phasendifferenz 90° oder 270° ist, dann kommt es zu dem Fall der Abb. 9.5B, dass die Kurve sich zunächst der Null annähert, aber dann wieder entfernt.

Die Wirkung von O<sub>2</sub> wird durch  $a e^{j\omega t}$  beschrieben, die von der um den Phasenwinkel  $\varphi$  verschobenen CO<sub>2</sub>-Wirkung mit  $bm e^{j\omega t + j\varphi}$ . Allgemein gilt, dass die Kurven in Abb. 9.4 und 9.5 sich aus dem Betrag der Summen dieser beiden Signale ergeben. Mit

$$a e^{j\omega t} + bm e^{j\omega t + j\varphi} = a e^{j\omega t} + bm e^{j\omega t} (\cos\varphi + j\sin\varphi) \quad (9.1)$$

folgt dann für die Amplitude des Signals:

$$y = \sqrt{a^2 - 2mab \cos\varphi + m^2b^2 \cos^2\varphi + m^2b^2 \sin^2\varphi} \quad (9.2)$$

und daraus

$$y = \sqrt{a^2 - 2mab \cos\varphi + m^2b^2} \quad (9.3)$$

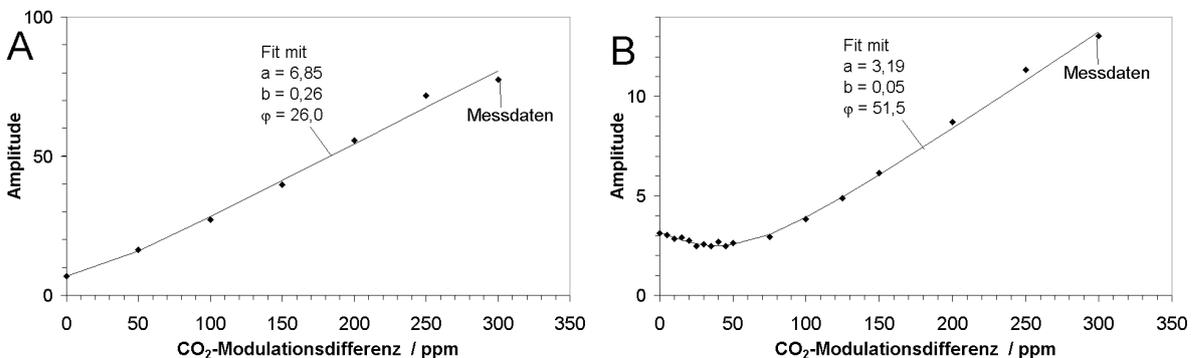
mit

$m$ : CO<sub>2</sub>-Modulation auf der x-Achse

$y$ : Betrag des gemessenen Signals auf der y-Achse

Für  $\varphi = 0$  oder  $\varphi = 180^\circ$  erhält man eine monoton steigende bzw. fallende Kurve wie in Abb. 9.4 oder 9.5A.

Durch richtige Wahl der Parameter wurde die Gleichung 9.3 an die Messkurven angepasst. In Abb. 9.7 finden sich hierzu zwei Beispiele, die zeigen, wie gut die Fits die Messpunkte treffen. Die über mehrere Messungen gemittelten Fitparameter stellt die Tabelle 9.1 dar.



**Abbildung 9.7:** Anpassung der Gleichung 9.3 auf Messungen wie in der Abb. 9.5. Die Punkte entsprechen den Messpunkten, die durchgezogene Kurve ist das Fit-Ergebnis. Lichtintensität: (A) 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bzw. (B) 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Es ist erkennbar, dass sich die verschiedenen Kurventypen aus der Abbildung 9.5A bzw. B auch in den Fit-Parametern unterscheiden. Insbesondere bei  $b$ , also dem CO<sub>2</sub>-Anteil des Signals, und der Phase  $\varphi$  ergeben sich deutliche Unterschiede.

Geht man von der Annahme aus, dass die Gasmodulation nur auf die RubisCO wirkt, so müsste in der Gleichung 9.3  $\varphi = 0$  sein, und dann würde gelten (für positive  $a$ ,  $b$ ,  $m$ ):

$$y = \sqrt{a^2 - 2mab + m^2b^2} = a + mb \quad (9.4)$$

Mit dem oben im Abschnitt 9.3 für die RubisCO am Kompensationspunkt genannten Wert von 17,5 ppm CO<sub>2</sub> und dem Wert für  $b$  für den Fall „A“ aus der Tabelle 9.1 würde folgen ( $y = 0$ ):

$$a = mb = 17,5 \text{ ppm} \cdot 0,291 \text{ ppm}^{-1} = 5,1 \quad (9.5)$$

**Tabelle 9.1:** *Fitparameter für die Anpassung der Gleichung 9.3 an die Kurven aus der Abbildung 9.5. Geometrisches Mittel der Parameter  $a$ ,  $b$  und  $\varphi$  über 8 bzw. 12 Messungen. Die unterschiedliche Streuung für + und – ergibt sich aus dieser Art zu mitteln und daraus, dass keine Faktoren, sondern Summanden angegeben sind.*

Kurventyp	$a$ (O <sub>2</sub> )		$b$ (CO <sub>2</sub> )		$\varphi$ (CO <sub>2</sub> )	
9.5A	7,79	+3,53	0,291	+0,042	311,7°	+43,1
		–2,43		–0,037		–37,9
9.5B	6,21	+6,75	0,156	+0,300	87,4°	+77,8
		–3,24		–0,103		–41,2

Dieser Wert liegt deutlich unter dem errechneten Wert für  $a$  von 7,79 in Tabelle 9.1. Dies könnte daran liegen, dass CO<sub>2</sub>-Konzentration außerhalb des Blattes gemessen wurde. Im Mesophyll und vor allem im Calvin-Zyklus sind diese deutlich geringer (Guo et al., 2005), allerdings nicht genau bekannt. Setzt man nun einen in der Veröffentlichung verwendeten Schätzwert von Faktor 2 ein, so kommt man auf einen CO<sub>2</sub>-Wert zwischen 17,5 und 35 ppm, und dann gilt  $a = 5,1 \dots 10,2$ . Der Fit-Wert aus der Tabelle 9.1 liegt in diesem Bereich.

Der Flusswert am Kompensationspunkt (falls es einen Schnitt mit der Achse gibt) bzw. bei kleinstem Signal passt also ungefähr zur RubisCO, allerdings zeigen die Phasenwinkel in der Tabelle, da sie von Null verschieden sind, an, dass es dennoch mehr Prozesse geben muss, die als Akzeptoren dienen. Für die Sauerstoff-Modulation ergibt sich dann für die beteiligten Prozesse die Gleichung

$$a \cos \varphi = O_{2\text{calv}} + O_{2x} \cos \varphi_x \quad (9.6)$$

mit

- $O_{2\text{calv}}$ : O<sub>2</sub>-Modulation vom Calvin-Zyklus
- $O_{2x}$ : O<sub>2</sub>-Modulation über andere unbekannte Akzeptoren
- $\varphi_x$ : Phasenwinkel der unbekanntenen Prozesse

Da aber wegen der ungenauen Kenntnis über die CO<sub>2</sub>-Konzentration im Chloroplasten eine genaue Bestimmung von  $O_{2\text{calv}}$  nicht möglich ist, erlaubt diese Gleichung leider auch nicht die Bestimmung der gesuchten  $O_{2x}$ . Aber es ergibt sich auf jeden Fall der Hinweis auf die Existenz weiterer Prozesse, die auf O<sub>2</sub> reagieren.

## 9.6 Zusammenfassung

Die Messungen in diesem Kapitel liefern folgende Erkenntnisse:

- O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Wirkungen laufen über verschiedene Wege, das heißt, es geht nicht alles über die RubisCO.
- Die Beteiligung von Nicht-RubisCO-Wegen tritt häufiger im Niederfrequenten auf (Stoffwechselprozesse langsamer als ca. 10 s).
- Die Beteiligung von Nicht-RubisCO-Wegen steigt mit der Lichtintensität (Abb. 9.6).



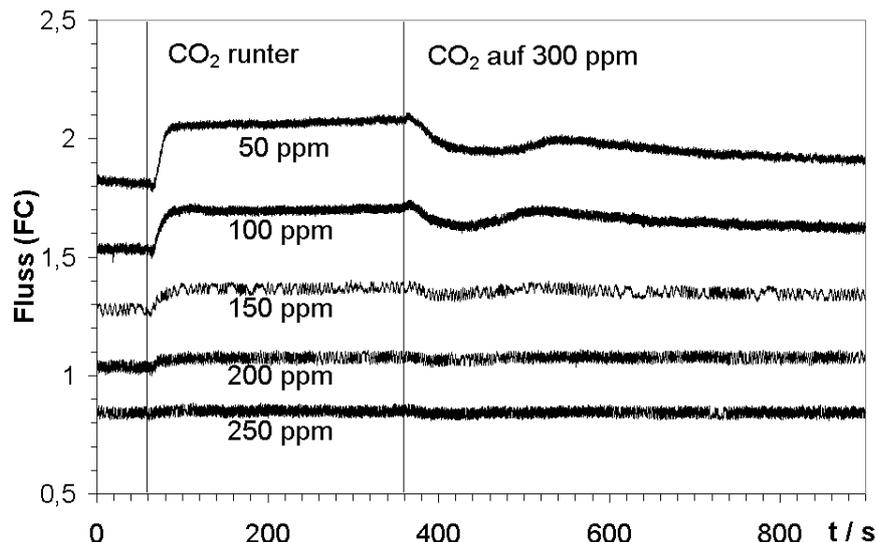
## Kapitel 10

# Gasflussmodulation an Weizen

Sowohl aus der im Kapitel 2 (Stand der Forschung) geschilderten Hypothese als auch aus den Ergebnissen des Kapitels 7 folgt die Erwartung, dass die Elektronenverzweigung hinter PS I eine zentrale Rolle bei einer Wirkung der Pilzinfektion auf metabolische Prozesse spielt. Die Verzweigung lässt sich dadurch studieren, dass man einzelne Elektronensenken separat moduliert. Einen für biophysikalische Online-Messungen sehr geeigneten messtechnischen Zugang bietet die Modulation von  $\text{CO}_2$  oder  $\text{O}_2$ .

Frequenzgangmessungen wie in Abb. 9.1, 9.2 und 9.3 haben den Vorteil, dass die Linearität der Antworten erzwungen und überprüft werden kann. Linearität ist unverzichtbar, um mathematische Analysen durchzuführen. Allerdings darf man dabei den folgenden Kernpunkt nicht übersehen: Der lineare Ansatz sagt nicht, dass eine beliebige Messung mit linearer Analyse ausgewertet wird, sondern der Versuch muss vorher so geplant werden, dass die lineare Analyse zulässig ist. Aber Frequenzgangmessungen benötigen sehr viel Zeit (1 bis 3 Tage für einen einzigen Frequenzgang). Im Allgemeinen kann man damit kein Screening durchführen, sondern nur Grundlagenforschung.

Bevor weitere Frequenzgangmessungen durchgeführt werden, wird hier erst einmal schnellerer Weg eingeschlagen: die Benutzung von sprungförmigen Gasänderungen (Abb. 10.1).

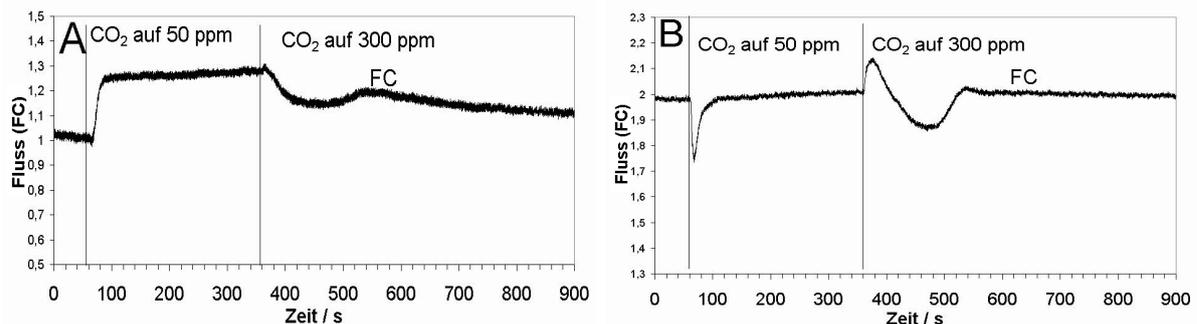


**Abbildung 10.1:** zeigt eine Versuchsreihe, bei der bei 60 s von „Normalluft“ ( $2\% \text{O}_2$ ,  $300 \text{ppm CO}_2$ , Rest  $\text{N}_2$ , Gesamtfluss:  $210 \text{ ml/min}$ ) auf die angegebene  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen umgeschaltet wurde. Nichtinfiziertes Weizenblatt, Lichtintensität:  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Zur besseren Übersicht sind die Kurven jeweils um 0,2 nach oben verschoben.

## 10.1 Gassprungantworten zur Unterscheidung von infizierten und nicht-infizierten Weizenblättern

Ein Teil der Weizenblätter wurde im Institut für Phythopathologie der CAU, wie im Abschnitt 4.1.2 (S. 25) beschrieben, mit *Septoria tritici* infiziert. Nach zwei Tagen in der Klimakammer bei hoher Luftfeuchte wurden die Pflanzen in das Labor in der Leibnizstraße transportiert, wo sie bis zur Messung max. 25 Tage verblieben. Die in Abb. 10.2 gezeigten Messungen wurden nach 7 Tagen an infizierten und nicht-infizierten Pflanzen durchgeführt, wobei auf den infizierten Blättern Blattstellen benutzt wurden, bei denen äußerlich noch keine Anzeichen des Befalls erkennbar waren.

Abb. 10.2 zeigt die FC-Antworten auf einen Gassprung von 300ppm CO<sub>2</sub> auf 50 ppm. Erwarten würde man zwei gegenläufige Effekte: Das eine wäre ein Abfall des mit FC gemessenen Flusses aus PS II, da mit der CO<sub>2</sub>-Erniedrigung Akzeptoren fortfallen. In die andere Richtung ginge die Erhöhung des thermischen Flusses, da der geringere ATP-Verbrauch zu einer erhöhten Thylakoid-Energetisierung und damit zu einem höheren Energy-Quenching führen würde (Hansen et al., 1993). Es fällt auf, dass bei den gesunden Pflanzen nur eine Erhöhung des gemessenen Exzitononflusses aus den PS-II-Antennen auftritt (Abb. 10.2A). Der Effekt auf die Energetisierung scheint also zu überwiegen. Infizierte Pflanzen reagieren mit einer kurzen Flusserniedrigung, gefolgt von einer Erhöhung, die auf das alte Flussniveau führt (Abb. 10.2B).



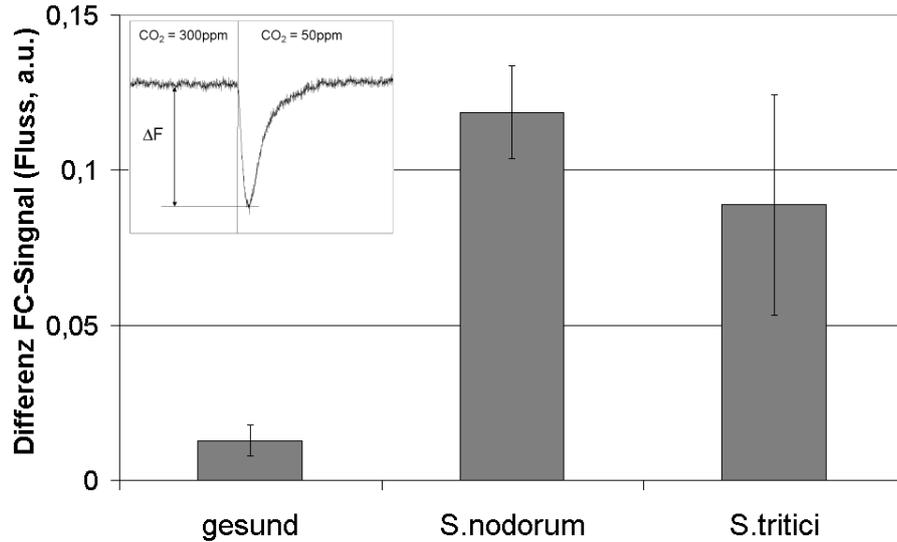
**Abbildung 10.2:** FC-Antworten der Chlorophyll-Fluoreszenz auf Gassprünge von 300 ppm CO<sub>2</sub> auf 50 ppm (O<sub>2</sub> = 2%, Rest N<sub>2</sub>). Lichtintensität: 700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (A) gesund, (B) mit *Septoria tritici* infiziert. Messzeit: April 2003

Aus weiteren Messungen (wie in Abb. 10.2) wurde die anfängliche Abwärtskomponente ( $\Delta F$  in der Skizze in Abb. 10.3) gemittelt und in Abb. 10.3 abgetragen. Man sieht, dass der Unterschied zwischen gesund und infiziert sehr stark ist und dass die Infektion mit *Septoria nodorum* einen stärkeren Effekt hat als mit *Septoria tritici*.

Wie eingangs erwähnt bestehen die in Abb. 10.2B dargestellten Antworten aus einer photochemischen und einer photothermischen Komponente. Diese beiden Anteile lassen sich mit der Sättigungsblitzmethode trennen (siehe Abschnitt 4.4.4).

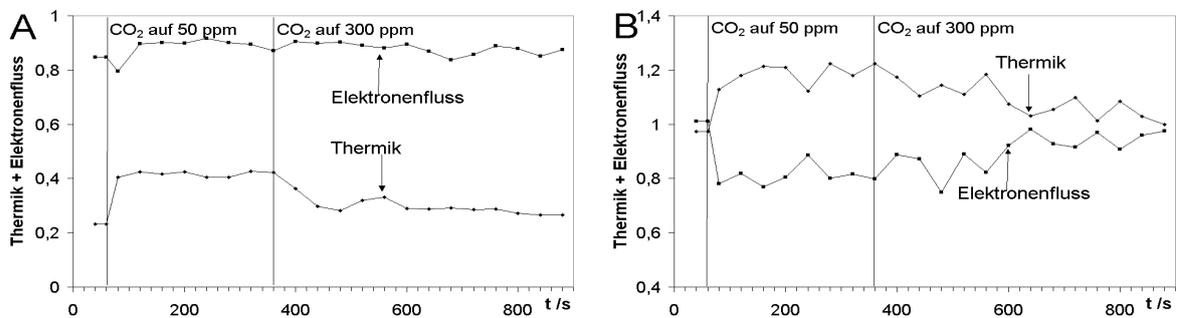
Abbildung 10.4 zeigt deutlich, dass bei gesunden Pflanzen (Abb. 10.4A) das Umschalten der Gaskonzentration eine nur kleine Änderung im photochemischen Fluss, wohl aber deutliche Erhöhung im nichtphotochemischen Quenching bewirkt. Hiernach ist die in Abb. 10.2 gezeigte Erhöhung des Exzitononflusses in PS II bei CO<sub>2</sub>-Verarmung auf eine Erhöhung der thermischen Deaktivierung zurückzuführen. Es könnte folgender Mechanismus dahinter stecken: Eigentlich geht der Fluss in den Calvin-Zyklus zurück, aber dies wird aufgefangen durch den etwas später einsetzenden Export von Redox-Äquivalenten in alternative PS-I-Akzeptoren, wie Mehler-Reaktion, N-Assimilation, Export in die Mitochondrien.

Bei infizierten Blättern hingegen ist das Bild anders (Abb. 10.4B): Die photochemischen Flüsse werden stärker verringert als bei gesunden Blättern, die Erhöhung des thermischen Fluss-



**Abbildung 10.3:** Anfängliche Abwärtskomponente  $\Delta F$  (photochemisch) bei FC-Antworten auf einen Gassprung von 300 ppm auf 50 ppm (siehe Abb. 10.2) bei gesunden Weizenblättern und bei Weizenblättern die vor 7-25 Tagen mit *Septoria nodorum* oder *Septoria tritici* infiziert worden (Mittelwerte aus jeweils vier Experimenten). Die Skizze zeigt, wie die dargestellte Größe aus den Messungen wie in Abbildung 10.2 entnommen wurde.

ses bleibt hingegen ähnlich groß. Die oben postulierte Kompensation fällt also aus. Dies bewirkt den kurzen Abfall direkt nach der Gasumschaltung im Gesamt-FC-Fluss (Abb. 10.2), der sich dann aber schnell auf den 300-ppm-Level wieder einstellt.



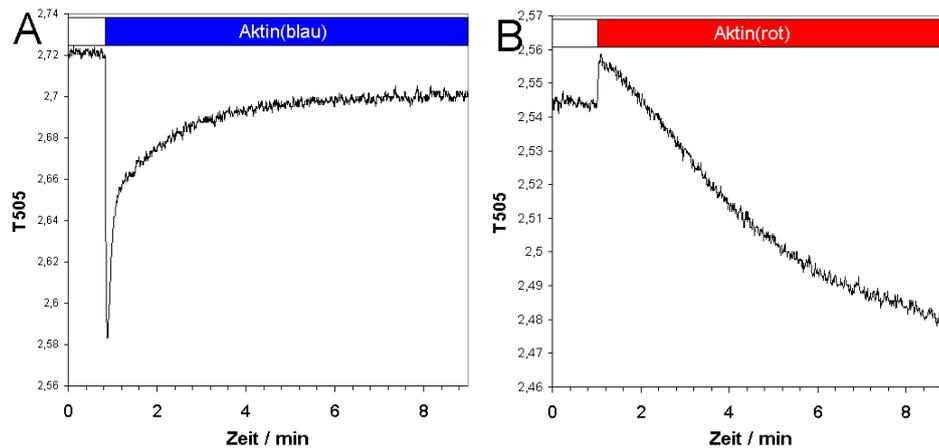
**Abbildung 10.4:** Trennung von photochemischen und photothermischen Komponenten in der FC-Yieldmessung beim Umschalten der  $\text{CO}_2$ -Konzentration von 300 ppm auf 50 ppm bei (A) gesunden und (B) mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern. Lichtintensität =  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die im Abschnitt 4.4.4 eingeführte Methode der Sättigungsblitze (Schreiber et al., 1986) dient dazu, photochemische und nicht-photochemische Flüsse zu unterscheiden. Die Scattering-Messungen (Abb. 10.6) zeigen ebenfalls eine Erhöhung des Energy-Quenchings.

## 10.2 Weitere Ausgangssignale

### 10.2.1 Vorversuche zur Chloroplastenbewegung

Der hier verwendete Messaufbau (Beschreibung in Abschnitt 4.5.2) sollte ursprünglich mit blauen LEDs für das Messlicht und das aktinische Licht bestückt werden. Beim Vergleich der LED- und Filterspektren in der Abbildung 4.11 mit den Chlorophyll-Spektren in Abbildung 4.5 fällt ein zweites Anregungsmaximum bei ca. 440 nm auf. Eine Fluoreszenzanregung bei dieser Wellenlänge mit blauen LEDs (NSPB500S, Nichia, Spektrum ebenfalls in Abb. 4.11) hätte den Vorteil, dass zur Trennung von Anregungs- und Emissionslicht nicht ein RG9 als Filter verwendet werden müsste, was auch viel Fluoreszenzlicht abschneidet, sondern ein RG610 (Schott, siehe selbe Abb.) würde ausreichen.

Aber blaue LEDs als aktinische Lichtquelle ergaben nach Einschalten des aktinischen Lichtes ein Ansteigen der Intensität auf dem A505-Detektor (Abb. 10.5A), obwohl eigentlich ein Abfall aufgrund der Zeaxanthin-Bildung zu erwarten war. Es zeigte sich, dass die Hinweise in der Literatur (Brugnoli und Björkmann, 1992; Brandt und Keston, 1965) doch sehr ernst zu nehmen sind, dass nämlich blaues Licht Chloroplastenbewegung auslöst, was insbesondere die 505- und 535 nm-Messungen beeinflusst und ebenfalls auch Quenching-Bestimmungen. Einzig Fernrot-Messungen scheinen unbeeinflusst (Brandt und Keston, 1965). Der Umbau auf rote LEDs beseitigte den unerwünschten Effekt (Abb. 10.5B). Rotes aktinisches Licht erzeugte eine Zunahme der Absorption, d. h., eine Abnahme der dargestellten Transmission.



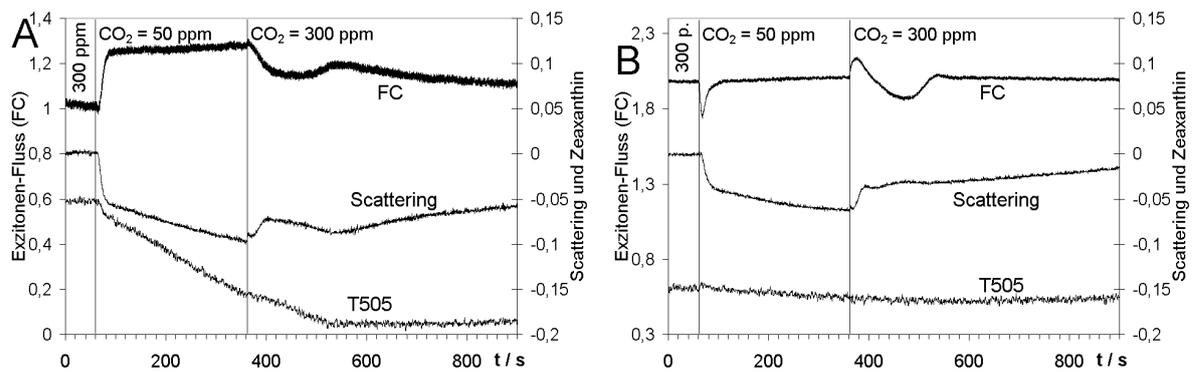
**Abbildung 10.5:** Reaktion des 505-Signals (dargestellt ist die Lichtintensität gemessen in Transmission) auf (A) blaues und (B) rotes Licht gemessen in der Messkammer nach Abb. 4.13. Die Intensität des aktinischen Lichtes betrug: blau  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und rot  $650 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Das Messlicht war  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 10.2.2 Übersicht über die Signale

Das Verhalten der thermischen Komponente in Abb. 10.4 lässt sich mit einer weiteren Messgröße bestätigen: dem Scattering-Signal. Abb. 10.6 zeigt neben der FC-Messung wie in Abb. 10.2 auch noch das Scattering bei 535 nm, gemessen als Rückstreuung (S535), und die Transmission bei 505 nm (T505) (Methoden siehe Abschnitt 4.5.2). S535 gilt als Maß des luminalen pHs (Gradient über der Thylakoidmembran), T505 (bzw. A505) als Maß für den Zeaxanthingehalt. Die Messungen im Kapitel 16 ergaben eine hohe Korrelation mit dem Zeaxanthingehalt aus HPLC-Messungen (siehe auch Bendixen et al., 2001). Das pH-Signal und das Zeaxanthinsignal haben eine starke Überlappung und lassen sich nicht rein spektral trennen. Es müssen die Zeitkonstanten mit folgender Regel zur Hilfe genommen werden:

- S535 ist der Signalanteil, der sich im 10-s Bereich ändert,
- T505 ist der Anteil, der sich langsam ändert und nach Lichtausschalten bestehen bleibt,
- T515 wird hier nicht betrachtet, da diese zur Membranspannung gehörenden Änderungen im ms-Bereich liegen und sehr klein sind (Dau et al., 1991).

### 10.2.3 Scattering bei 535 nm: Membran-Energetisierung



**Abbildung 10.6:** Vergleich von FC-Yieldmessungen mit Scattering bei 535 nm (S535) und Zeaxanthinbildung (T505) beim Umschalten der  $\text{CO}_2$ -Konzentration in einem (A) gesunden Blatt und in einem (B) mit *Septoria tritici* infizierten Blatt. Lichtintensität =  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . S535 und T505 sind als Lichtintensitäten dargestellt (Originalaufzeichnungen), d. h., eine Abnahme von S535 entspricht einer Zunahme des luminalen pH.

Die Scattering-Messungen bestätigen die Messungen mit Sättigungsblitzen. Scattering verhält sich wie die thermische Komponente in Abb. 10.4 (In den Messungen in dieser Arbeit ist das gemessene Scattering-Signal invers zur Thylakoid-Energetisierung, also proportional zum luminalen pH.). Dies ist zu erwarten, da die thermische Deaktivierung vom luminalen pH abhängt (Krause et al., 1982; Briantais et al., 1979). Das Scattering-Signal bestätigt, dass in der thermischen Deaktivierung, zumindest bei diesen Versuchen unter High-Light, kein Unterschied in Abhängigkeit von der Infektion auftritt. Der Unterschied liegt im photochemischen Signal. Unter Low-Light sieht dies anders aus, wie der Abschnitt 10.2.5 zeigen wird.

Die unterschiedlich langsame Komponente im Scattering-Signal ist wahrscheinlich ein „Übersprechen“ des Zeaxanthin-Signals. Wie bereits oben erwähnt, ist eine rein spektrale Trennung der Signale bei 505 nm, 515 nm und 535 nm nicht möglich, sondern das Zeitverhalten muss mit hinzugenommen werden.

### 10.2.4 Absorption bei 505 nm: Zeaxanthin

Das Zeaxanthinsignal, T505, zeigt interessante Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Pflanzen: Bei gesunden Pflanzen (Abb. 10.6A) wächst die Absorption nach Erniedrigung der Gaskonzentration (gezeigte Transmission nimmt ab). Die Anregung der Zeaxanthinbildung geschieht nach Ruban et al. (2002) und Yamamoto und Kamite (1972) durch den pH-Gradienten. Damit entspricht die  $\text{CO}_2$ -Verminderung der Erhöhung der Lichtintensität. Bei infizierten Pflanzen fällt die Zeaxanthin-Antwort sehr schwach aus. Dies erinnert an die ammonium-ernährten Pflanzen, bei denen nach den Ergebnissen von Bendixen et al. (2001) ein großer Ascorbatmangel die licht-induzierte Zeaxanthin-Bildung verhinderte. Ob Ascorbat, das möglicherweise durch die ROS-Bildung bei der Pilzabwehr (siehe Kapitel 14) verbraucht wird, hier eine ähnliche Rolle spielt, muss offen bleiben. Jedenfalls fanden Levall und Bornman (2000) eine Abnahme des Zeaxanthins bei Befall, was zu der obigen Messantwort passen würde.

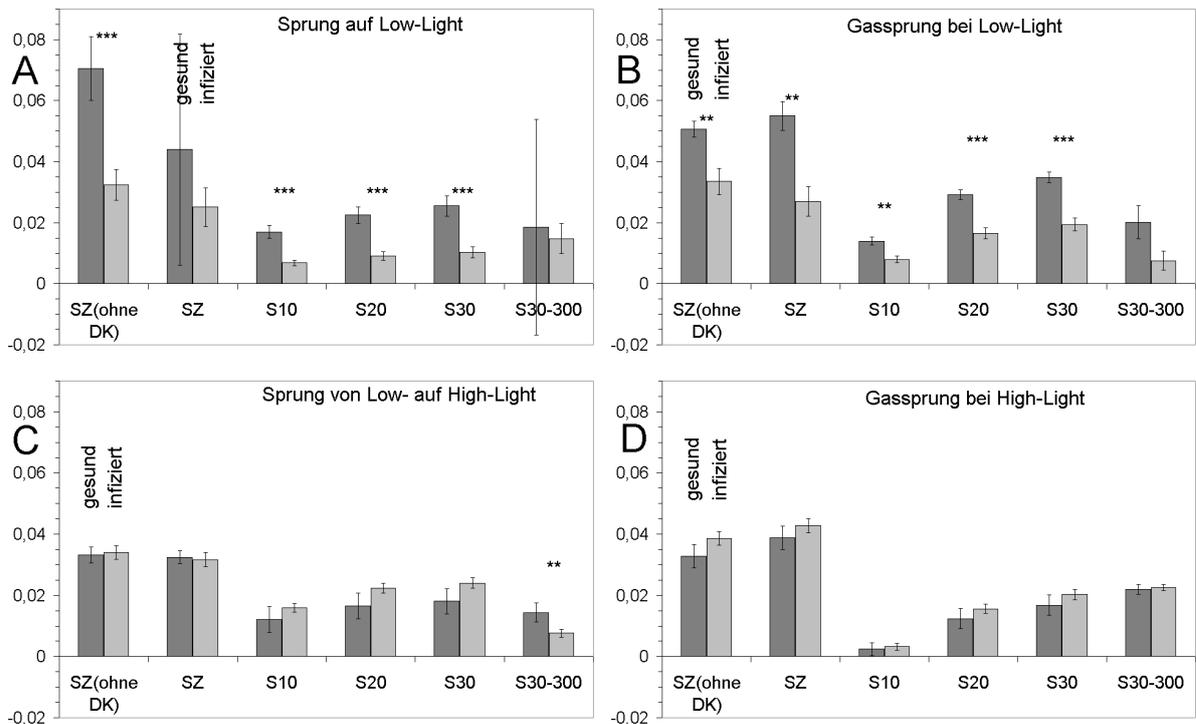
### 10.2.5 Quantitative Analyse des Scattering-Signals

Zur quantitativen Analyse des Scatterings-Signals wie in der Abbildung 10.6 wurden zu mehreren Zeitpunkten die Messwerte erfasst:

- zu Beginn der Messung (Wert:  $S_{Start}$ ),
- kurz vor dem Gas- bzw. Lichtsprung ( $S_0$ ),
- 10, 20 und 30 s nach dem Sprung ( $S_{10}$ ,  $S_{20}$ ,  $S_{30}$ ),
- 5 Minuten nach dem Sprung  $S_{300}$ .

Daraus wurden Differenzen zwischen dem Wert  $S_0$  und denen danach gebildet und die Drift mit Hilfe des Signales  $S_{Start}$  und  $S_0$  nach Gleichung 16.6 korrigiert (Details siehe Abschnitt 16.5).

Die Abbildung 10.7 zeigt Mittelwerte der Antworten auf Lichtsprünge (Low- (A) und High-Light (C)) sowie CO<sub>2</sub>-Sprünge von 300 auf 50 ppm bei Low- (B) oder High-Light (D). Bei statistisch signifikant verschiedenen Mittelwerten von gesunden und infizierten Blättern (t-Test) sind die zusammengehörigen Balken in der Abb. 10.7 mit „\*\*\*“ ( $p = 0.001$ ) bzw. „\*\*“ ( $p = 0.05$ ) gekennzeichnet.



**Abbildung 10.7:** Scattering-Signal ( $S_{535}$ ) bei gesunden und mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern (Messzeit: August/September 2003). Aus den Messungen wie in Abb. 10.6 wurden an den im Text genannten Messpunkten die Werte bestimmt und dann die Größen nach Gleichungen 16.6 bis 16.9 berechnet. SZ(ohne DK): Änderung des 535-Signals nach Einschalten des Lichtes ohne Driftkorrektur, SZ: selbes Signal mit Driftabzug, S10 bis S30: Veränderungen 10 bis 30 s nach „Licht an“, S30-300: Veränderungen zwischen 30 s und 300 s nach „Licht an“. Siehe Gleichungen 10.1 bis 10.3. Eingezeichnet sind die Mittelwerte ( $N_{\text{ges}} = 5 \dots 7$ ,  $N_{\text{inf}} = 20 \dots 22$ ). Bei den mit „\*\*“ und „\*\*\*“ markierten Säulen sind die Mittelwerte für gesund und infiziert signifikant verschieden ( $p = 0.05$  bzw.  $p = 0.001$ ). Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. (A) Low-Light-Sprung (auf  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (B) CO<sub>2</sub> Sprung von 300 auf 50 ppm bei LL, (C) Sprung von Low- auf High-Light ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (D) CO<sub>2</sub> Sprung von 300 auf 50 ppm bei HL.

Der Wert SZ(ohne DK) gibt den (negativen) Zuwachs im Scattering-Signal vom Zeitpunkt vor dem Einschalten ( $S_0$ ) des aktinischen Signales (Licht-Erhöhung oder  $\text{CO}_2$ -Erniedrigung) bis zum Messpunkt 5 min später ohne Driftkorrektur an:

$$SZ = S_0 - S_{300} \quad (10.1)$$

SZ ist der nach Gleichung 16.6 drift-korrigierte SZ(ohne DK)-Wert. Der Umgehung des Problems der fehlenden spektralen Trennung zwischen Scattering- und Zeaxanthin-Signal dienen die Differenzen zwischen dem Start-Wert und den Messwerten 10, 20 und 30 s nach dem Schalten (in Abb. 10.7 mit  $S_{10}$ ,  $S_{20}$  und  $S_{30}$  bezeichnet), z. B.:

$$S_{10} = S_0 - S_{10} \quad (10.2)$$

Sie zeigen die Veränderungen in den ersten 30 s an und damit den Anteil der Thylakoid-Energetisierung. Die Differenz  $S_{30}-300$  hingegen stellt den weiteren Verlauf nach dem Kurzzeitbereich bis hin zu 5 min dar (also den auf Zeaxanthin-Bildung zurückzuführenden Anteil):

$$S_{30} - 300 = S_{30} - S_{300} \quad (10.3)$$

Bei den Lichtsprüngen (Abb. 10.7A, C) treten in den ersten 10 s schon starke Änderungen auf. In den ersten 30 s fällt das Signal schon um mehr als die Hälfte von dem ab, was es insgesamt in den ersten 5 min zeigt.

### Signifikante Unterschiede zwischen gesunden und infizierten Pflanzen

Der t-Test ergibt folgenden signifikante Unterschiede zwischen gesunden und infizierten Blättern:

- bei Low-Light nur im schnellen Bereich sowohl für den Lichtsprung (Abb. 10.7A) auch als für den Gassprung (Abb. 10.7B),
- bei High-Light nur im langsamen Bereich hier, nur für den Lichtsprung (Abb. 10.7C).

Unterschiede in der licht- oder  $\text{CO}_2$ -stimulierten Thylakoid-Energetisierung zwischen infizierten und nicht infizierten Blättern treten also signifikant nur bei Low-Light-(LL)-Bedingungen auf. Obige Messungen stehen nicht im Widerspruch zu Abb. 10.6, denn dort war die Messung unter High-Light erfolgt. Deshalb ist kein Unterschied im Scattering sichtbar. Diese höhere Empfindlichkeit gegenüber Infektion begegnet uns noch an anderen Stellen dieser Arbeit: bei den Frequenzgängen (Kapitel 11), den Blitzrückstellflanken (Kapitel 7) und den ROS-Messungen (Kapitel 14). Im Kapitel 18 wird dazu folgendes Szenario diskutiert: Stimulation der Thylakoid-Energetisierung durch Licht oder  $\text{CO}_2$ -Erniedrigung tritt auf, wenn der Elektronenfluss stärker ist als der Anteil, der für die ATP-Synthese benötigt wird. Das bedeutet, es stehen genug Elektronensenken neben dem Calvin-Zyklus zur Verfügung, die kein ATP verbrauchen. Bei Pilzbefall scheinen einige dieser Senken abgeschaltet zu sein, die Thylakoid-Energetisierung wird schwächer.

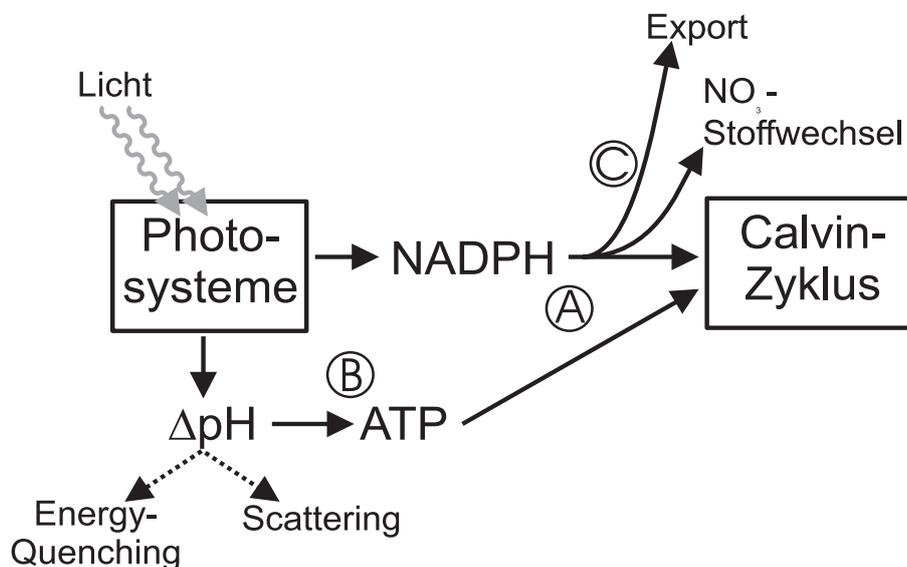
Dass dies nur bei LL-Bedingungen auftritt, bedeutet, dass diese Senken sättigbar sind (wie zum Beispiel die Mehler-Reaktion, Wu et al., 1991). Die bei mehr Licht aktivierten Senken sind offenbar weniger von den Auswirkungen der Infektion betroffen. Dieser Befund wird durch die andere Messungen in dieser Arbeit noch weiter bestätigt, wie im Kapitel 18 (Fazit und Ausblick) diskutiert wird.

### 10.2.6 Transmission bei 505 nm: Zeaxanthin

Im obigen Abschnitt war auf das Verhalten des Zeaxanthins aus der langsamen Komponente des Scattering-Signales bei 535 nm geschlossen worden. Doch die in Abb. 10.6 exemplarisch dargestellten Messungen, die die Grundlage der Auswertungen in Abb. 10.7 und Abb. 10.11 bilden, enthalten noch das A505-Signal direkt. Die Auswertung dieser Messungen wird jedoch auf das Kapitel 16 verschoben, um es dort gemeinsam mit den chemischen HPLC-Bestimmungen des Zeaxanthins darzustellen.

## 10.3 Schlüsse aus den CO<sub>2</sub>-Gassprungmessungen

Die FC- und Scattering-Messungen zeigen wieder, dass die oben mehrfach (Blitzrückstellflanken in den Abschnitten 6.5 und 7.5 und FR-Licht-Wirkung in 8.4) skizzierte und in Abb. 10.8 noch einmal dargestellte Hypothese gültig ist:



**Abbildung 10.8:** Modell der Flüsse, die zu den oben beschriebenen Phänomenen führen.

A: photochemischer Fluss in den Calvin-Zyklus

B: Energy-Quenching-Abnahme durch den ATP-Verbrauch des Calvin-Zyklus

C: Export aus den Chloroplasten, der z. T. den Fluss in den Calvin-Zyklus bei CO<sub>2</sub>-Verarmung übernimmt (nicht Photorespiration).

Im normalen Betrieb der Photosynthese müssen Redox-Äquivalente nicht nur an den Calvin-Zyklus, sondern auch noch an alternative Akzeptoren abgegeben werden, sonst würde der Elektronenfluss nicht ausreichen, um genügend ATP für den Calvin-Zyklus bereit zu stellen (Abb. 10.8). Der Abgleich zwischen den beteiligten Akzeptoren ist für jede Umweltbedingung neu einzustellen, wobei die beteiligten Regelmechanismen kaum bekannt sind. Die Schwingung beim Ausschalten des Gases in Abb. 10.2 weist auf die Existenz von Feed-Back-Systemen hin. Wenn man die in den obigen Abschnitten berichteten Beobachtungen im Rahmen dieses Konzeptes erklären möchte, kann Folgendes festgestellt werden:

- Bei CO<sub>2</sub>-Mangel werden die Redox-Äquivalente, die sonst als NADPH über den Weg A in den Calvin-Zyklus gehen würden, zu alternativen Akzeptoren (C) umgeleitet.
- Bei gesunden Pflanzen geschieht die Umschaltung so reibungslos, dass man im photochemischen Fluss vom PS II in die ETC kaum etwas merkt.
- Die exportierten Redox-Äquivalente (C) gehen zu Akzeptoren, die kein chloroplastisches ATP über den Weg B verbrauchen. Da aber trotzdem über den Elektronenfluss ein pH-

Gradient aufgebaut wird, erhöht sich damit das Energy-Quenching (und damit die Absorption bei 535 nm).

- Bei infizierten Pflanzen scheinen weniger alternative Akzeptoren zur Verfügung zu stehen, denn der photochemische Elektronenfluss sinkt mit dem CO<sub>2</sub>-Gehalt.

Der Weg C, der Redox-Äquivalente übernimmt, hängt nicht mit der RubisCO zusammen. Mögliche alternative Wege sind (Guo et al., 2005):

1. Stickstoff-Assimilation,
2. Mehlerreaktion,
3. Chlororespiration,
4. mitochondriale Atmung,
5. zyklischer Elektronentransport um PS I,
6. Photorespiration.

Von diesen Akzeptoren verbrauchen Nr. 2, 3 4, und 6 Sauerstoff. Ihre Rolle im Detail aufzuklären ist Anliegen der meisten Kapitel dieser Arbeit. Photorespiration nimmt eine Sonderrolle ein insofern, als sie auch über die RubisCO läuft und sich in der Redox/ATP-Bilanz nicht allzu sehr von der Carboxylierung unterscheidet. Insbesondere wird sie als Ersatz-Akzeptor nicht zum ATP-Aufbau, sondern eher wie die Carboxylierung zum Abbau beitragen.

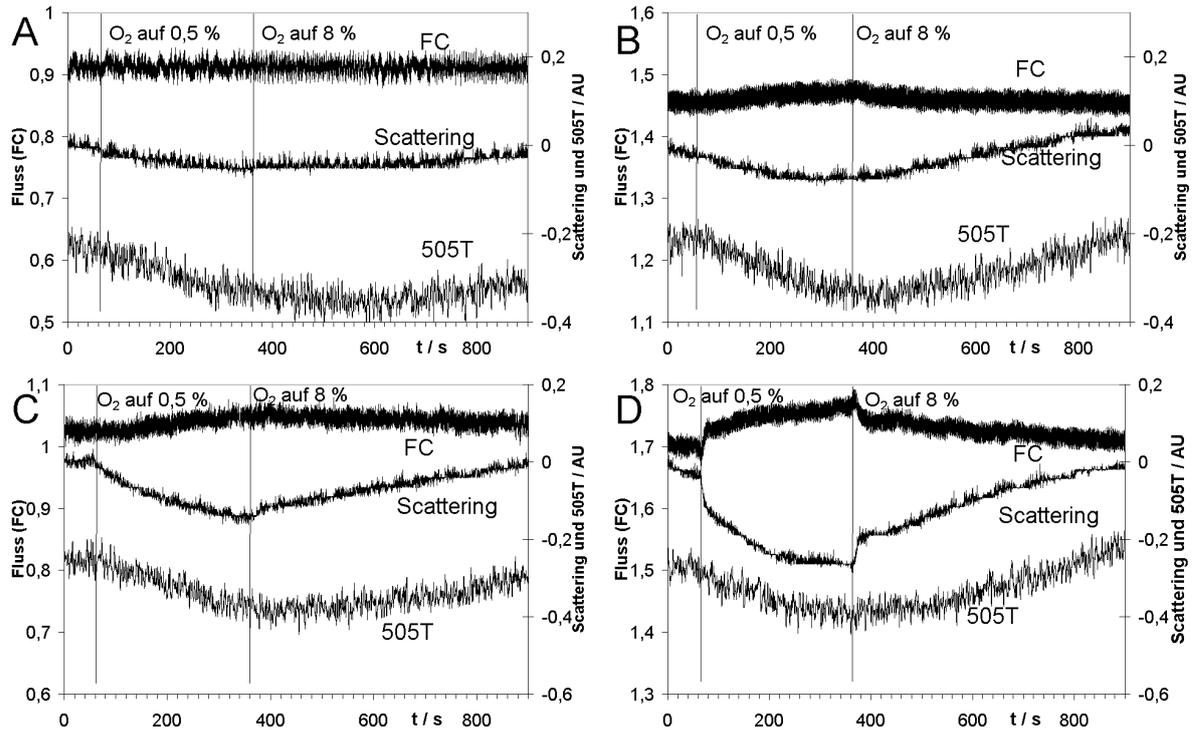
## 10.4 O<sub>2</sub>-Sprünge bei gesundem und infiziertem Weizen

Im Anschluss an Abb. 10.8 wurden mehrere potenzielle PS-I-Akzeptoren erörtert. Dabei traten vier Mechanismen auf, die auf Veränderungen der O<sub>2</sub>-Konzentration reagieren müssten. Drei von ihnen, Mehlerreaktion, Chlororespiration und mitochondriale Atmung, würden den ATP-Gradienten erhöhen, einer, die Photorespiration, ihn genau wie die Carboxylierung erniedrigen. Aus diesem Grunde wird im Folgenden die Wirkung einer Erniedrigung der O<sub>2</sub>-Konzentration auf FC-Fluss, Scattering und Zeaxanthinbildung untersucht.

### 10.4.1 Ergebnisse und Diskussion

Abb. 10.9A bis 10.9D zeigen die Antworten des photosynthetischen FC-Flusses, des Scattering- und des Zeaxanthin-Signals auf einen O<sub>2</sub>-Sprung von 8% auf 0,5% an gesunden und infizierten Weizenblättern jeweils unter zwei verschiedenen Bedingungen aufgenommen mit Low-Light (LL = 160 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) und High-Light (HL = 700 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

Signifikante Effekte im FC-Fluss und in der Thylakoid-Energetisierung treten nur nach HL-Vorbeleuchtung (Abb. 10.9C und D) auf, und das im wesentlichen nur bei infizierten Pflanzen (Abb. 10.9D). Deshalb werden sie zuerst besprochen. In Abb. 10.9D (infiziert, HL) sieht man eine starke Thylakoid-Energetisierung, die durch die schnelle Erniedrigung im S535-Signal angezeigt wird (der Ursprung der langsamen Komponente bleibt ohne weitere Untersuchungen zunächst unklar, kann aber ein Übersprechen des Zeaxanthin-Signales bedeuten). Der Anstieg dieser Thylakoid-Energetisierung überkompensiert die Abnahme des ETC-Flusses im FC-Signal, weshalb das FC-Signal nach dem anfänglichen kurzen Abfall nach unten nach unten (photochemisch) stark nach oben geht (thermische Deaktivierung). Dies entspricht dem Verhalten unter CO<sub>2</sub>-Anregung in Abb. 10.2. Bei gesunden Blättern in Abb. 10.9C ist die schnelle Wirkung auf die Thylakoidenergetisierung sehr gering, auf den FC-Fluss nicht nachweisbar.



**Abbildung 10.9:** Effekt eines O<sub>2</sub>-Sprunges auf den FC-Fluss, das Scattering (S535), das Zeaxanthin-Signal (T505) unter LL ( $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und HL ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bei gesunden und mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern. Es wird kontinuierlich mit unterschiedlichen Konzentrationen gespült. CO<sub>2</sub>: 300 ppm, Rest N<sub>2</sub>, Gesamtfluss 210 ml/min, konstant, Umschaltung von 8% O<sub>2</sub>: für 60-360 s auf 0,5% O<sub>2</sub> und zurück auf 8% bei 360 s. S535 und T505 stellen die Lichtintensitäten dar (Originalaufzeichnung), fallendes Scattering entspricht steigender Energetisierung. (A) gesund, Low-Light, (B) infiziert, LL, (C) gesund, High-Light, (D) infiziert, HL

Das wichtigste Ergebnis der Abb. 10.9 ist also, dass unter HL in infizierten Blättern ein Stoffwechselweg aktiviert wird, der sehr O<sub>2</sub>-sensitiv ist. Hier stellt sich die Frage, welche O<sub>2</sub>-empfindlichen Akzeptoren vor dem Herunterschalten der O<sub>2</sub>-Konzentration aktiv waren. Dies können sein:

1. Mehler-Reaktion,
2. Export an die Mitochondrien,
3. verstärkte Photorespiration.

Bei allen drei Prozessen erzeugt eine Absenkung der O<sub>2</sub>-Konzentration einen sinkenden Elektronenfluss. Die ersten beiden Prozesse sind an einen geringen ATP-Verbrauch gekoppelt, der letztere an einen hohen. Ein Herunterfahren dieser Prozesse würde bei den ersten beiden zu einer Abnahme der thermischen Deaktivierung führen, bei dem dritten zu einer Erhöhung. Die in Abb. 10.9D beobachtete Erhöhung kann damit nur so erklärt werden, dass in infizierten Pflanzen unter HL eine starke Photorespiration aktiv ist. Eine mögliche Ursache hierfür ergibt sich in Kapitel 12 aus der Beobachtung, dass die Öffnung der Stomata sich bei Pilzbefall vermindert und die stomäre Leitfähigkeit und die Nettophotosyntheserate sinken. Dies würde durch den CO<sub>2</sub>-Verbrauch durch die RubisCO das CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Verhältnis im Blatt erniedrigen und so die Photorespiration stärken.

Diese Stärkung kann aus folgender Abschätzung erhalten werden: Die FC-Änderungen der Thylakoid-Energetisierung sind ungefähr so groß wie bei einem Sprung von 300 ppm CO<sub>2</sub> auf

50 ppm. Nach obiger Rechnung (Abschnitt 9.3, S. 86) zur Selektivität der RubisCO anhand von Abb. 10.9 wurde dargestellt, dass ein Sprung von ca. 6% O<sub>2</sub> durch einen Sprung von ca. 20 ppm CO<sub>2</sub> kompensiert wird. Die O<sub>2</sub>-Sprungantwort in Abb. 10.9D ist also unerwartet hoch und entspricht nicht der einer 20 ppm CO<sub>2</sub>-Änderung, sondern eher einer von 200 ppm. Diese hohe O<sub>2</sub>-Empfindlichkeit würde eine gewaltige Steigerung der Oxygenase-Aktivität der RubisCO bedeuten. Ob wirklich so extreme Werte vorliegen, muss durch weitere Versuche belegt werden.

Ein Erhöhen der Photorespiration allerdings löst nicht das Problem der ATP-Erzeugungstöchiometrie. Auch pilzinfizierte Pflanzen müssen Akzeptoren haben, die nicht-ATP-verbrauchende Elektronenflüsse ermöglichen.

Bei der gesunden Pflanze in Abb. 10.9C ist die Photorespiration, also die O<sub>2</sub>-Wirkung auf die RubisCO, schwächer. Dies wird daran deutlich, dass die Erhöhung der Membran-Energetisierung im S535-Signal wesentlich kleiner ist, als auch daran, dass die Änderungen im FC-Fluss nicht so groß sind wie in Abb. 10.6A.

Das T505-Signal erlaubt keine eindeutigen Aussagen. Bei gesunden wie auch infizierten Pflanzen (Abb. 10.9) verlaufen die langsame Komponente des S535-Signals und das T505-Signal parallel und gehen auch gemeinsam, wenn auch langsam, zurück. Das T505-Signal bei gesunden Pflanzen (Abb. 10.9A, C) klingt in beiden Fällen etwas langsamer ab als bei den infizierten Pflanzen (Abb. 10.9B, D). Ein „Stehenbleiben“ der 505-Messung wird als Anzeichen genommen, dass das T505-Signal die Bildung von Zeaxanthin anzeigt. Doch ob Zeaxanthin gebildet wird, ist zur Zeit nicht zu entscheiden, da der Rückgang in einem Zeitbereich liegt, der keine eindeutige Aussage erlaubt. Deshalb wird die Frage der Zeaxanthin-Bildung bei infizierten Pflanzen durch weitere Untersuchungen im Kapitel 16 geklärt, wobei die T505-Messungen mit HPLC-Bestimmungen des Zeaxanthins (wie in Bendixen et al., 2001) verglichen werden.

#### 10.4.2 Fazit aus den O<sub>2</sub>-Sprung Messungen

Die oben gezeigten O<sub>2</sub>-Sprung-Messungen ergänzen die Erkenntnis aus den vorigen CO<sub>2</sub>-Sprung-Messungen bei infizierten Pflanzen:

Bei infizierten Pflanzen scheint der Export an die Mitochondrien herabgesetzt zu sein. Die O<sub>2</sub>-Messungen ergeben den Hinweis (Abb. 10.9D), dass stattdessen die Photorespiration bei Infektion stark ansteigt. Das Umschalten des PS-I-Elektronenflusses von Export in die Mitochondrien auf Photorespiration wirft jetzt aber das Problem der ATP-Stöchiometrie auf. Es müssten weitere nicht-ATP-verbrauchende Wege beteiligt sein, die hier noch nicht identifiziert werden konnten.

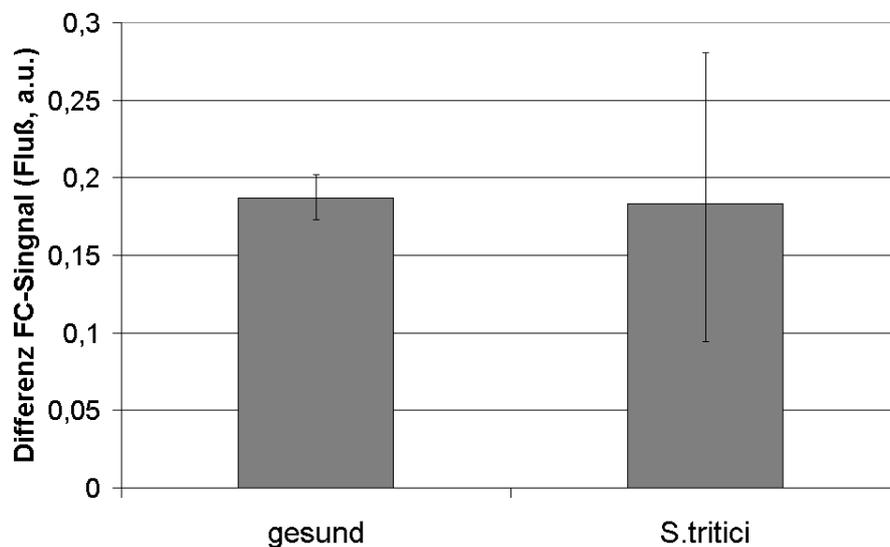
In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse von Abb. 10.9C und D durch weitere Messungen ergänzt. Hierzu gehört die Vertiefung der Aussagen aus den Gas-Sprungantworten dieses Kapitels und aus den Blitzrückstellflanken (Kapitel 6 und 7) durch die Ergänzung der alten Frequenzgangmessungen (Abb. 9.1) mit neuen in Kapitel 11.

## 10.5 Jahreszeitliche Unterschiede

Um zu untersuchen, ob die oben gezeigten deutlichen Unterschiede auf die CO<sub>2</sub>-Sprünge zwischen gesunden und infizierten Pflanzen im photochemischen Fluss (FC-Messung) und in der Thylakoid-Energetisierung (Scattering) konstant sind, wurden weitere Messungen zu einer anderen Jahreszeit durchgeführt

### 10.5.1 Photochemischer Fluss

Die Messung der in der Abb. 10.3 gezeigten anfänglichen Abwärtskomponente des FC-Signales auf eine Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration wurde ein Jahr später wiederholt. Das Ergebnis findet sich in der Abb. 10.10. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Unterschied zwischen gesunden und mit *Septoria tritici* infizierten Blättern aus der ersten Messung verschwunden ist.



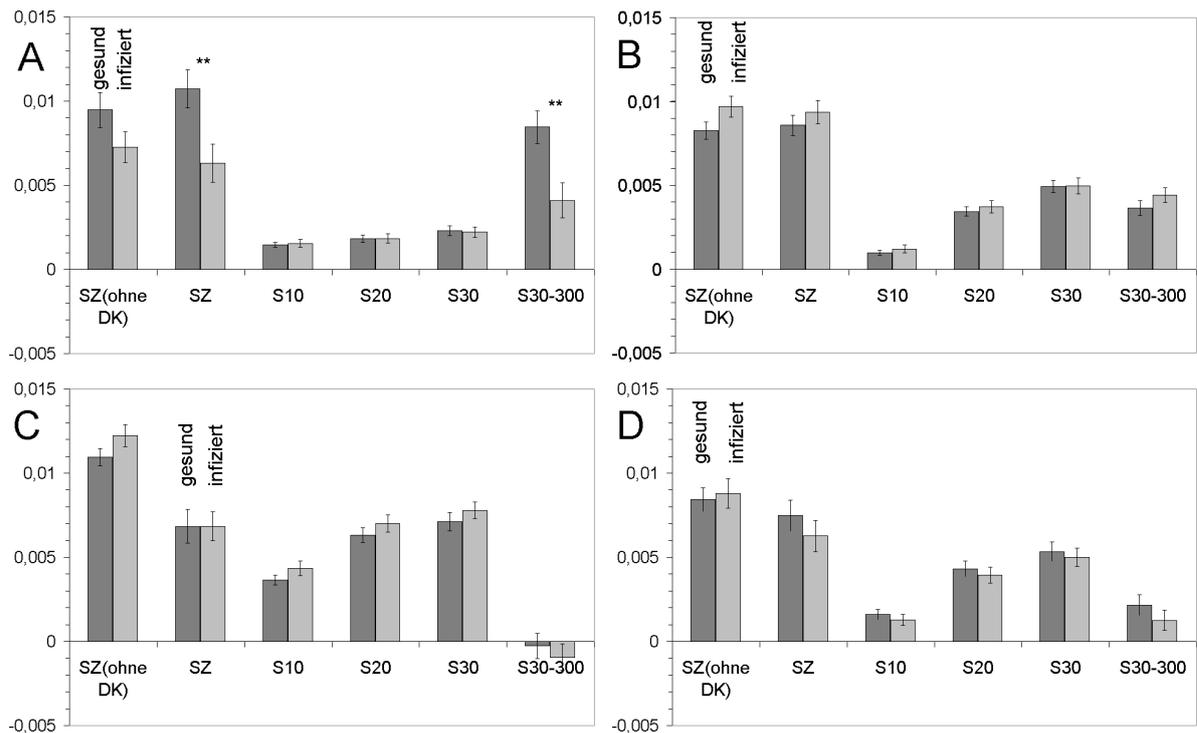
**Abbildung 10.10:** Anfängliche Abwärtskomponente  $\Delta F$  (photochemisch, Definition siehe Abb. 10.3) bei FC-Antworten auf einen Gassprung von 300 ppm auf 50 ppm bei gesunden Weizenblättern und bei Weizenblättern die vor 7-20 Tagen mit *Septoria tritici* infiziert worden waren. Mittelwerte aus jeweils 19 Experimenten. Die Messung fand im Juni 2004 statt.

### 10.5.2 Scattering

Die Abbildung 10.11 hat die Funktion, die Hoffnung auf ein zuverlässiges Detektionsverfahren für Pilzbefall, die nach den recht deutlichen Ergebnissen in Abbildung 10.7 aufkommen mag, ein wenig zu dämpfen. Biologische Objekte sind extrem variabel. Mögliche Ursache für die jetzt dargestellten Abweichungen vom Verhalten in Abbildung 10.7 mag die Messzeit sein (Juni 2004 gegenüber August/September 2003), doch können andere unbekannte Ursachen nicht ausgeschlossen werden.

Das Messprotokoll für Abbildung 10.11 ist identisch mit dem in Abbildung 10.7. Verschwunden ist jetzt jedoch der Unterschied zwischen gesund und infiziert in den licht- und CO<sub>2</sub>-induzierten Scattering-Erhöhungen unter LL, während das aussageschwache Bild unter HL sich für den licht-induzierten Sprung wiederholt.

Bemerkenswert ist, dass die Zeaxanthinbildung hier bereits bei LL eine stärkere Licht-Induktion ausweist, während bei HL keine Stimulierung mehr auftritt.



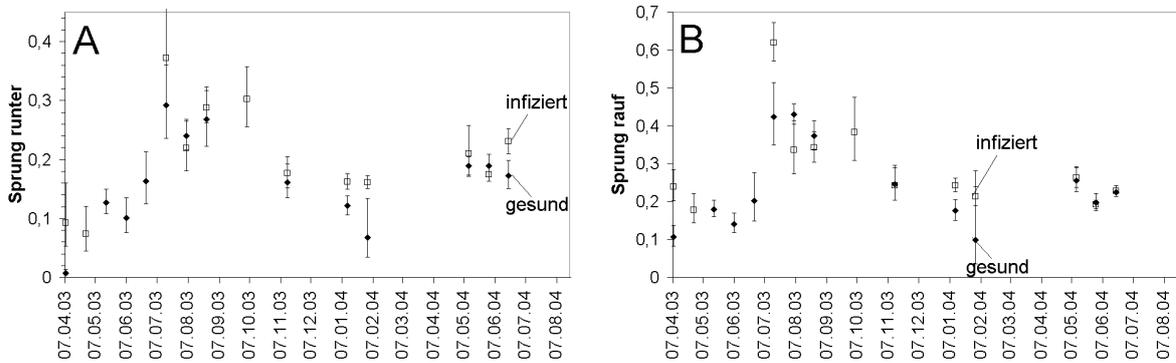
**Abbildung 10.11:** Messungen im Juni 2004: Scattering-Signal ( $S_{535}$ ) bei gesunden und mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern (Juni 2004). Aus den Messungen wie in Abb. 10.6 wurden an den im Text genannten Messpunkten die Werte bestimmt und dann die Größen nach Gleichungen 16.6 bis 16.9 berechnet. SZ(ohne DK): Änderung des 535-Signals nach Einschalten des Lichtes ohne Driftkorrektur; SZ: selbes Signal mit Driftabzug; S10 bis S30: Veränderungen 10 bis 30 s nach „Licht an“; S30-300: Veränderungen zwischen 30 s und 300 s nach „Licht an“. Siehe Gleichungen 10.1 bis 10.3. Eingezeichnet sind die Mittelwerte ( $N = 19$ ). Bei den mit „\*\*“ und „\*\*\*“ markierten Säulen sind die Mittelwerte für gesund und infiziert signifikant verschieden ( $p = 0.05$  bzw.  $p = 0.001$ ). Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. (A) Low-Light-Sprung (auf  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (B)  $\text{CO}_2$  Sprung von 300 auf 50 ppm bei LL, (C) Sprung von Low- auf High-Light ( $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), (D)  $\text{CO}_2$  Sprung von 300 auf 50 ppm bei HL.

### Bemerkung

Die beiden Messungen aus den Abbildungen 10.7 und 10.11 zeigen zum einen, dass das Scattering-Signal deutliche Unterschiede zwischen gesunden und infizierten Pflanzen anzeigen kann, es andererseits aber auch sehr variabel ist, so dass dieser Effekt je nach Jahreszeit und Pflanzenzustand auch verschwinden kann.

### 10.5.3 Darstellung des Jahresganges der Änderungen

Die bei den Gassprungmessungen im Abschnitt 10.1 als Reaktion des Exitonenflusses (FC-Messung) für einen CO<sub>2</sub>-Sprung von 300 auf 50 ppm ermittelten Werte für die Abwärtskomponente ( $\Delta F$  in der Skizze in der Abbildung 10.3) und die Komponente danach wieder hinauf weisen über verschiedene Messserien eine große Streuung auf. Da diese Messungen über einen größeren Zeitraum durchgeführt wurden, war es möglich, diesen Parameter für je 20 Tage zu mitteln und über die Jahreszeit aufzutragen. Abbildung 10.12 zeigt hierzu die Ergebnisse.



**Abbildung 10.12:** Jahreszeitengang der Antworten auf einen Gassprung: (A) Anfängliche Abwärtskomponente ( $\Delta F$  in der Skizze in der Abbildung 10.3) (B) Aufwärtskomponente danach von gesunden und mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern, gemittelt über jeweils die Messungen, die in einem Zeitraum von 20 Tagen gemacht wurden, und aufgetragen über das jeweilige Datum. Mittelwerte über 2–20 Messungen. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an.

Erkennbar ist eine deutliche Variabilität des Messparameters. Da beide Parameter (Komponente nach unten, welche mit dem Elektronenfluss zusammenhängt, und die Komponente hinauf, welche den Aufbau der Thylakoid-Energetisierung anzeigt) sich ungefähr gleich verhalten, sieht es so aus, als würde sich nur die Empfindlichkeit des Systems über das Jahr ändern. Wichtig für die Frage einer messtechnischen Erfassung des Infektionszustandes ist, dass eine für jeden Zeitraum gültige Linie, die gesunde von infizierten Blättern trennt, nicht existiert.

Leider fehlte die Zeit für langjährige Versuche. Doch bis auf den Ausreißer vom 16.7.03 deutet sich in den vorliegenden Daten eine Periodizität beider Kurvenverläufe an, die vermuten lässt, dass die Jahreszeit eine Rolle spielt. Dieser Schluss wird unterstützt durch Berichte in der Literatur über jahreszeitliche Unterschiede für

- Netto-CO<sub>2</sub>-Assimilationsrate (Manter et al., 2000),
- Antioxidantien und ROS-fangende Enzyme (Gillham und Dodge, 1987),
- Glutathione-Reduktase (Hausladen und Alscher, 1994),
- Glucose, Phenole, Glucose (Esterbauer et al., 1975) oder
- Antioxidantien (Anderson et al., 1992).

# Kapitel 11

## Frequenzgänge

Im Kapitel 9 waren bereits Frequenzgang-Messungen an Giersch durchgeführt worden. Dort führten die unterschiedlichen Frequenzgänge für CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> auf die Aussage, dass es neben der RubisCO noch andere Akzeptoren geben muss. Dies war im Kapitel 10 mit Gassprungsmessungen an Weizen vertieft worden.

In diesem Kapitel sollen nun mit erneuten Frequenzgang-Messungen dieses Mal mit gesundem und infiziertem Weizen unter Stoffwechselfgiften die Aussagen aus den obigen Kapiteln vertieft werden.

### 11.1 Messaufbau und Ablauf

Die Frequenzgang-Messungen wurden mit dem Gasfluss-Messplatz durchgeführt, der im Abschnitt 4.5.2 (S. 42) beschrieben wird. Die Erzeugung der sinusförmigen Gasanregung wurde von dem im Abschnitt 4.5.3 beschriebenen Programm gesteuert, welches auch aus den gemessenen Anregungsantworten die Fourier-Amplitude und Phase errechnete.

Wie schon im Kapitel 9 wurde der Frequenzbereich von 1–0,001 Hz in 24 Schritte geteilt mit einer logarithmischen Skala. Für eine Messung bei einer dieser Frequenzen wurde eine entsprechende sinusförmige Gasanregung erzeugt, welche sechs Perioden lang war, von denen nur die letzten drei ausgewertet wurden. So hatte das Blatt genügend Einschwingzeit.

Es wurde entweder konstant 4% O<sub>2</sub> verwendet und CO<sub>2</sub> von 150–300 ppm moduliert oder konstant 300 ppm CO<sub>2</sub> bei einer O<sub>2</sub>-Modulation von 2–8%. Der Stickstoff-Fluss war auf konstant 200 ml/min eingestellt.

Eine Messung (Gesamtdauer: ca. 19h) umfasste dann hintereinander:

- 10 Minuten Adaption auf Low-Light mit eingeschaltetem Gas: 300 ppm CO<sub>2</sub>, 4% O<sub>2</sub>,
- Messung CO<sub>2</sub>-Frequenzgang mit 150–300 ppm bei 4% O<sub>2</sub>,
- Messung O<sub>2</sub>-Frequenzgang mit 2–8% O<sub>2</sub> bei 300 ppm CO<sub>2</sub>,
- 10 Minuten Adaption auf High-Light mit Gas: 300 ppm CO<sub>2</sub>, 4% O<sub>2</sub>,
- Messung CO<sub>2</sub>-Frequenzgang mit 150–300 ppm bei 4% O<sub>2</sub>,
- Messung O<sub>2</sub>-Frequenzgang mit 2–8% O<sub>2</sub> bei 300 ppm CO<sub>2</sub>.

Die Blätter wurden jeweils am Abend vorher unter Wasser abgeschnitten und in die folgenden Lösungen gestellt, so dass die Blätter die Gifte mit dem Transpirationsstrom aufnehmen konnten:

- nur SM (Kontrolle),
- 10 mM Glyceraldehyd in SM,

- 5 mM SHAM in SM,
- 10  $\mu$ M Antimycin in SM,
- 5 mM SHAM mit 10  $\mu$ M Antimycin in SM.

## 11.2 Ergebnisse

Abb. 11.1 bis 11.5 zeigen Frequenzgangmessungen an gesunden und infizierten Weizenblättern. Die Daten an infizierten Blättern sind aufgeteilt in solche, bei denen die Infektion zwei Tage bzw. drei Tage alt war. Der Amplitudengang ist jeweils auf der linken, der Phasengang auf der rechten Seite dargestellt. Die Phase im Hochfrequenten dreht teilweise sehr weit. Dies ist auf ein Artefakt zurückzuführen, und zwar auf Gaslaufzeiten von der Modulationsstelle bis zum Blatt.

In unvergifteten Blättern (Abb. 11.1A) sind unter Schwachlicht die Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Blättern sehr gering. Es ist kein signifikanter Effekt auf Phase oder Amplitude zu erkennen. Unter Starklicht findet man zumindest am 2. Infektionstag bei CO<sub>2</sub>-Modulation eine Herunterskalierung der Amplitude. Am 3. Tag nähert sich der Amplitudengang im Hochfrequenten dem der gesunden Blätter und im Niederfrequenten dem vom 2. Infektionstag an. Bei O<sub>2</sub>-Modulation unter Starklicht ist im Niederfrequenten der Effekt gegenläufig zu dem der CO<sub>2</sub>-Modulation. Dies mag ein Hinweis auf erhöhte Photorespiration sein, wie sie ja auch bereits im Abschnitt 10.4 angedeutet wurde. Im Hochfrequenten ist der Effekt auf die O<sub>2</sub>-Modulation wesentlich unübersichtlicher: eine Erhöhung am 3. Infektionstag und eine Erniedrigung am 2. Infektionstag.

Bei Giften werden die Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Blättern deutlicher. Da eine Diskussion Bild für Bild sehr unübersichtlich würde, sind aus den Daten der Abbildungen 11.1 bis 11.5 die aufgetretenen Veränderungen in Tabellenform zusammengestellt: Tabelle 11.1 zeigt die Unterschiede in der Wirkung der Inhibitoren gegenüber den unvergifteten Blättern getrennt für gesunde und für infizierte Blätter am 2. und 3. Infektionstag. In Tabelle 11.2 werden getrennt für verschiedene Gifte die Unterschiede der infizierten Blätter gegenüber den gesunden dargestellt. Die Aussagen der Tabelle 11.2 sind unmittelbar aus den Abbildungen 11.1 bis 11.5 abzulesen. Für die Tabelle 11.1 sind die Frequenzgänge umsortiert worden. Diese Graphen sind aus Platzgründen hier jedoch nicht gezeigt.

Folgende Unterschiede zwischen den Behandlungen (infiziert gegen gesund bzw. Inhibitor gegen Kontrolle) sind in den Tabellen eingetragen:

- $\uparrow$ : Für alle Frequenzen ist die Amplitude größer geworden.
- $\downarrow$ : Für alle Frequenzen ist die Amplitude kleiner geworden.
- Nf bzw. Hf: Die obigen Änderungen gelten nur für niedrige bzw. hohe Frequenzen. Die Grenze liegt bei ca. 0.01 Hz.
- $\cap$ : Es entsteht ein hochfrequenter Buckel (bei ca. 0.03 Hz) bei O<sub>2</sub>-Modulation.
- V: Es tritt eine Kerbe im Frequenzgang (meistens bei ca. 0.007 Hz) auf.
- V Hf: Es tritt eine hochfrequente Kerbe auf.
- +180: Die Phase dreht um 180° stärker, das heisst, ein anderer Weg der Gaswirkung auf den FC-Fluss hat die Vorherrschaft übernommen. Die Phase gibt Auskunft über die Veränderung der Amplitude mit der Frequenz (Bode, 1945). Insofern ist sie ein zuverlässigeres Maß für Änderungen der Form von Amplitudenfrequenzgängen.

Die Phasenunterschiede in Abb. 11.1 bis 11.5 sind nicht sehr signifikant bis auf gelegentliche Drehungen von 180°. Geringe Phasenunterschiede bedeuten, dass die Wirkungen von Infektion und Inhibitoren auf die Frequenzgänge nicht sehr dramatisch sind, das heisst, dass die

hier betrachteten Umwelteinflüsse keine starken Änderungen an der Kurvenform ergeben haben. 180°-Drehungen entstehen dadurch, dass die Vorherrschaft bei zwei gegenläufig wirkenden Wegen wechselt.

### 11.2.1 Aussagen der Tabelle 11.1

Unter Low Light fallen in Tabelle 11.1 vier Merkmale auf: 180°, Kerbe, Kerbe Hf und Buckel. Glyceraldehyd bewirkt bei gesunden und infizierten Pflanzen stets eine Kerbe bei CO<sub>2</sub>, allerdings schwächer ausgeprägt bei infizierten Blättern. Zur Zeit lässt sich nur sagen, dass die Balance der langsamen Reaktionen, die Redox-Äquivalente von PS I übernehmen, sich untereinander oder gegenüber der Membran-Energetisierung verschoben hat. Das Entstehen eines hochfrequenten Buckels ( $\cap$ ) im O<sub>2</sub>-Amplitudengang, mag ein Hinweis sein, dass hier eine Reaktion stimuliert wird, die schnell O<sub>2</sub> verbraucht. In Frage kämen chloroplastische O<sub>2</sub>-Verbraucher wie die Mehlerreaktion. Mitochondriale Atmung würde wahrscheinlich in einem niederfrequenten Zeitbereich wirken. Erhöhte Photorespiration sollte sich wie in den unten besprochenen Fällen im niederfrequenten Bereich auswirken und sich vor allem in einem inversen Effekt auf den CO<sub>2</sub>-Amplitudengang spiegeln.

**Tabelle 11.1:** Veränderung der Amplituden- und Phasengänge unter Inhibitor-Wirkung im Vergleich zur Kontrolle. Man erhält die Aussagen durch Umsortieren der Frequenzgänge in Abb. 11.1 bis 11.5. Verwendete Symbole: ↓: für alle Frequenzen ist die Amplitude unter Giftwirkung kleiner geworden, ↑: für alle Frequenzen größer, V: Kerbe im Frequenzgang (meist bei 0,007 Hz),  $\cap$ : hochfrequenter Buckel (bei ca. 0,03 Hz), Hf bzw. Nf schränken das „alle Frequenzen“ auf hohe bzw. niedrige ein (Grenze liegt bei ca. 0,01Hz), in Klammern: schwächere Effekte.

	gesund		Infektion 2. Tag		Infektion 3. Tag			
	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>		
LL	A	$\varphi$	A	$\varphi$	A	$\varphi$		
Glyc	V	+360	$\cap$ Hf	+180	(V)	+360	( $\cap$ Hf)	
SHAM	↓Hf		V Hf		V		$\cap$ Hf	
Antim								
S+A	V	+360		+360	V	+360	$\cap$ Hf	
HL	A	$\varphi$	A	$\varphi$	A	$\varphi$	A	$\varphi$
Glyc	↓	-180	↑		(↓)		↑	
SHAM	↓				(↓)		↑	
Antim					↑Nf		(↑)	
S+A	↓		↑		↓		(↑)	

Bei SHAM tritt in gesunden Pflanzen kein besonderer Effekt auf, erst bei infizierten Pflanzen unter Schwachlicht kommt es zum hochfrequenten Buckel im O<sub>2</sub>-Frequenzgang und auch die Kerbe wird verstärkt. Antimycin A zeigt keine Wirkung unter Schwachlicht. Erst zusammen mit SHAM ergibt sich bei gesunden Blättern und am 3. Infektionstag eine Kerbe, am 2. und 3. Infektionstag ein hochfrequenter O<sub>2</sub>-Buckel.

Unter Starklicht tritt ein eindrucksvolles Phänomen auf: Zu einer Verkleinerung der CO<sub>2</sub>-Wirkung auf die Amplitude gehört eine verstärkte O<sub>2</sub>-Wirkung, und zwar über den ganzen Frequenzbereich. Dies sieht sehr danach aus, dass die RubisCO die Oxygenierung zu Lasten der Carboxylierung verstärkt hat.

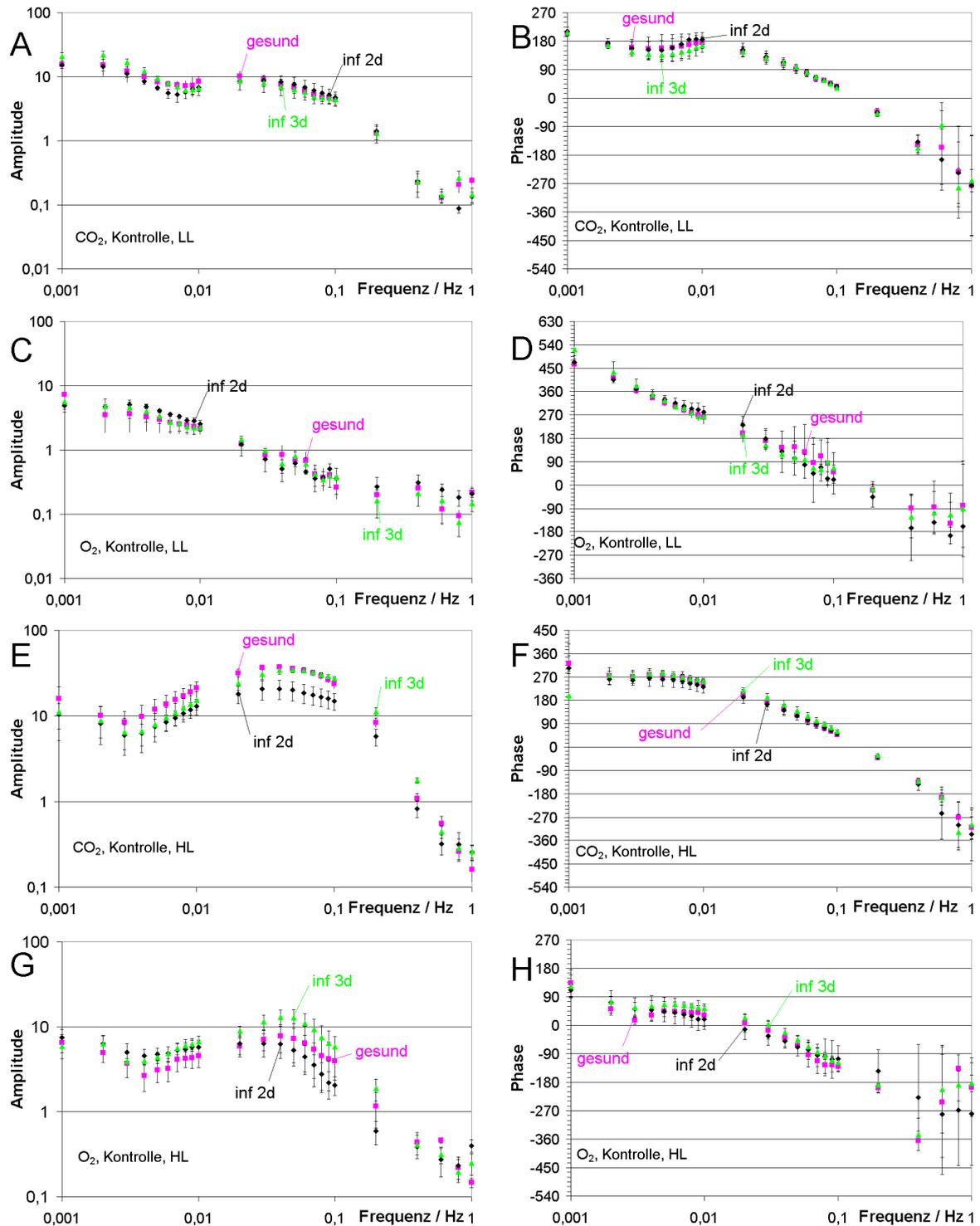
### 11.2.2 Aussagen der Tabelle 11.2

**Tabelle 11.2:** Veränderung der Amplituden- und Phasengänge der infizierten Blätter gegenüber den gesunden. Man erhält die Aussagen direkt aus den Frequenzgängen in Abb. 11.1 bis 11.5. Verwendete Symbole: ↓: für alle Frequenzen ist die Amplitude bei den infizierten kleiner geworden als bei den gesunden, ↑: für alle Frequenzen größer, V: Kerbe im Frequenzgang (meist bei 0,007 Hz), Hf bzw. Nf schränken das „alle Frequenzen“ auf hohe bzw. niedrige ein (Grenze liegt bei ca. 0,01Hz), in Klammern: schwächere Effekte.

	Infektion 2. Tag				Infektion 3. Tag			
	CO <sub>2</sub>		O <sub>2</sub>		CO <sub>2</sub>		O <sub>2</sub>	
LL	A	φ	A	φ	A	φ	A	φ
Kontrolle								
Glyc. Typ 1			(↓Nf) ↓Hf	-180	↑Nf		(↓Nf) ↓Hf	-180
Glyc. Typ 2			↑Nf (↑Hf)		↑Nf		↑Nf (↑Hf)	
SHAM	V		↑Nf		V		↑Nf	
Antimycin								
SHAM+Antim.	↑Nf		↑		V			
HL								
Kontrolle	↓		↑Nf ↓Hf		↓Nf		↑	
Glyceraldehyd	↓Hf		↑Hf		↑	+180	↓Nf ↑Hf	
SHAM	↓		↑		V		↑	
Antimycin	↓		↑		↓Nf (↓Hf)		↑	
SHAM+Antim	(↓Nf)				↓Nf		↓Nf	

Um die durch den Pilzbefall erzeugten Veränderungen in den Frequenzgängen deutlicher sichtbar zu machen, werden sie in Tabelle 11.2 getrennt nach Inhibitor unter dem Gesichtspunkt „infiziert gegenüber gesund“ dargestellt. Unter Schwachlicht sind Effekte nur im Niederfrequenten zu finden (bis auf Glyceraldehyd). Aber auch die Kerbe bedeutet einen Einfluss auf die niederfrequenten Komponenten, also diejenigen, die mit langsamen Zeitkonstanten den Abfluss aus dem PS-I-Akzeptorpool regeln. Unter Starklicht findet man unter fast allen Bedingungen am 2. und am 3. Infektionstag eine Verminderung der CO<sub>2</sub>-Wirkung, zumindest im Niederfrequenten, gekoppelt an eine Erhöhung der O<sub>2</sub>-Wirkung. Diese Kopplung wurde bereits bei der Besprechung von Tabelle 11.1 als ein Hinweis auf erhöhte Photorespiration gewertet. Ausnahmen sind der umgekehrte Effekt bei Glyceraldehyd am 3. Infektionstag und die gleichsinnige Verkleinerung bei Antimycin A plus SHAM am 3. Infektionstag. Die Kerbe am 3. Infektionstag bei SHAM ist komplizierter zu beurteilen. Die Unterschiede im Auftreten der beiden Typen unter Glyceraldehyd konnten nicht geklärt werden.

Auf jeden Fall gibt sich aus der überwiegenden Anzahl der obigen Bedingungen eine Stimulation der Photorespiration, insbesondere bei unvergifteten Blättern. Dies entspricht den Befunden in Abb. 10.9, die auch auf erhöhte Photorespiration hinwiesen und die auch in Verbindung zu den Messungen zur Stomata-Öffnung und zur Netto-Photosyntheserate in Kapitel 12 zu sehen sind.



**Abbildung 11.1:** (A,C,E,G) Frequenz- und (B,E,F,H) Phasengang bei gesundem und vor zwei oder drei Tagen mit *Septoria tritici* infiziertem Weizen mit (A,B,E,F) CO<sub>2</sub>- oder (C,D,G,H) O<sub>2</sub>-Modulation. Ohne Stoffwechselgift (Kontrolle) bei (A-D) Low-Light, (E-H) High-Light. Mittelwert über 2–3 Messungen, Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an.

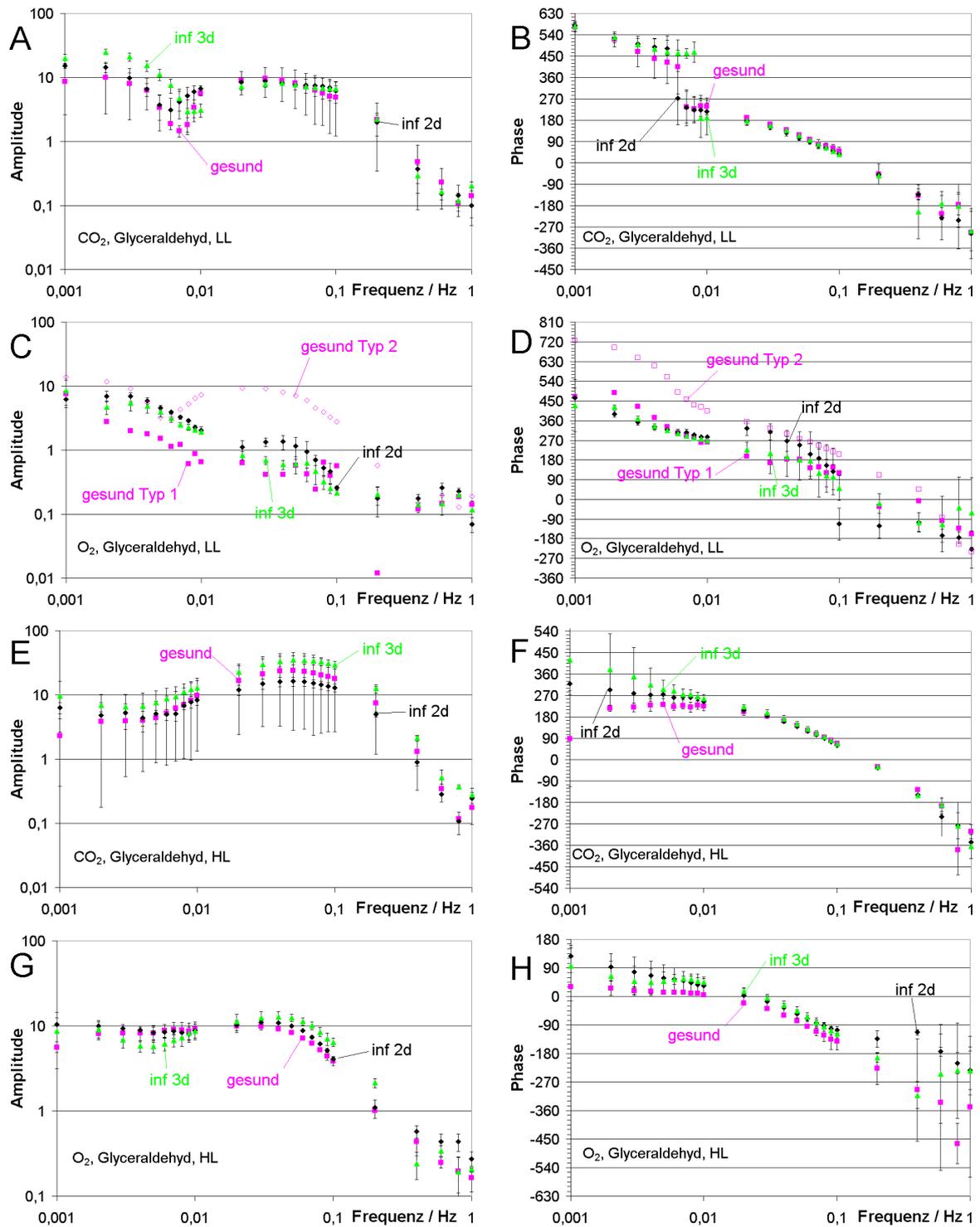
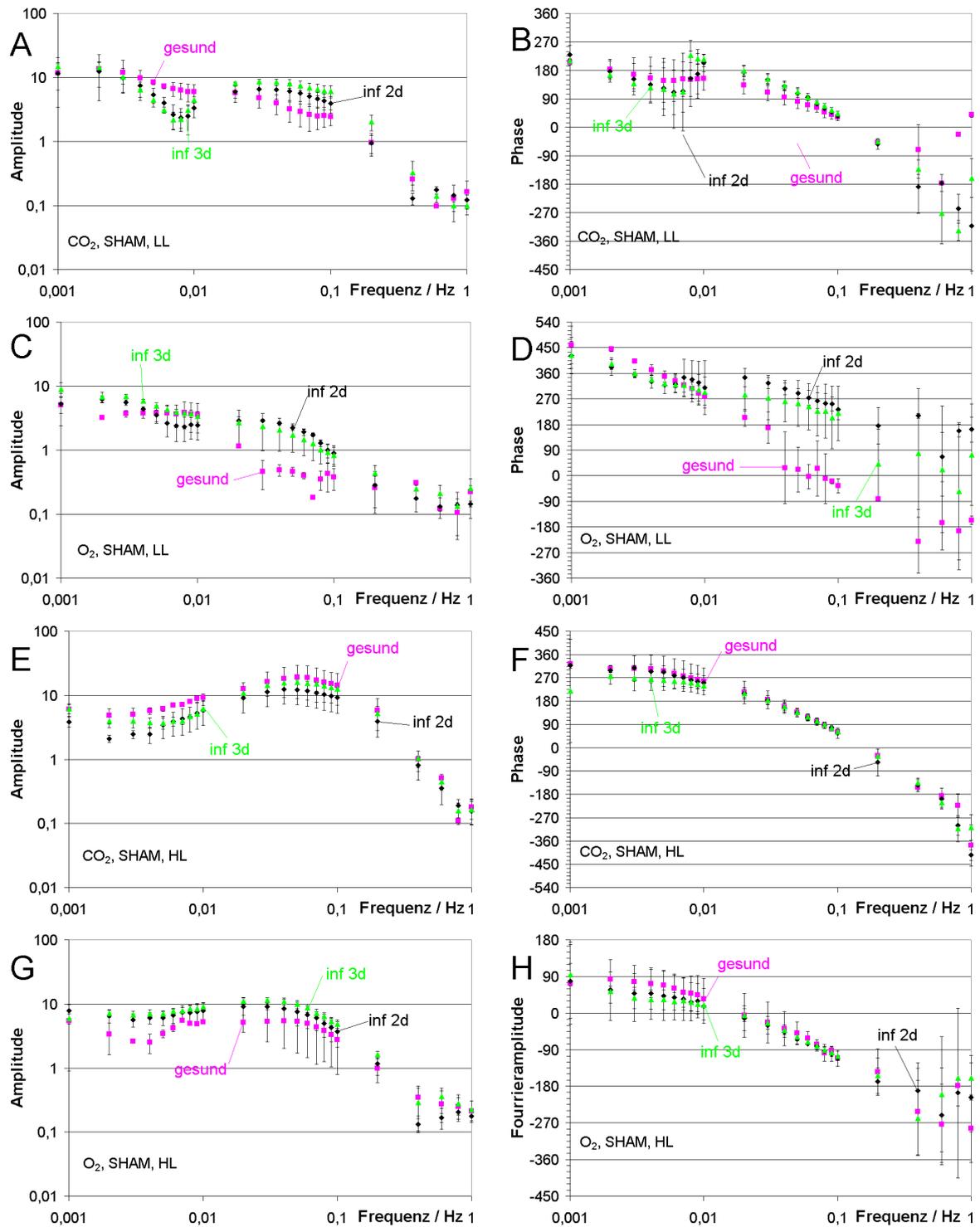
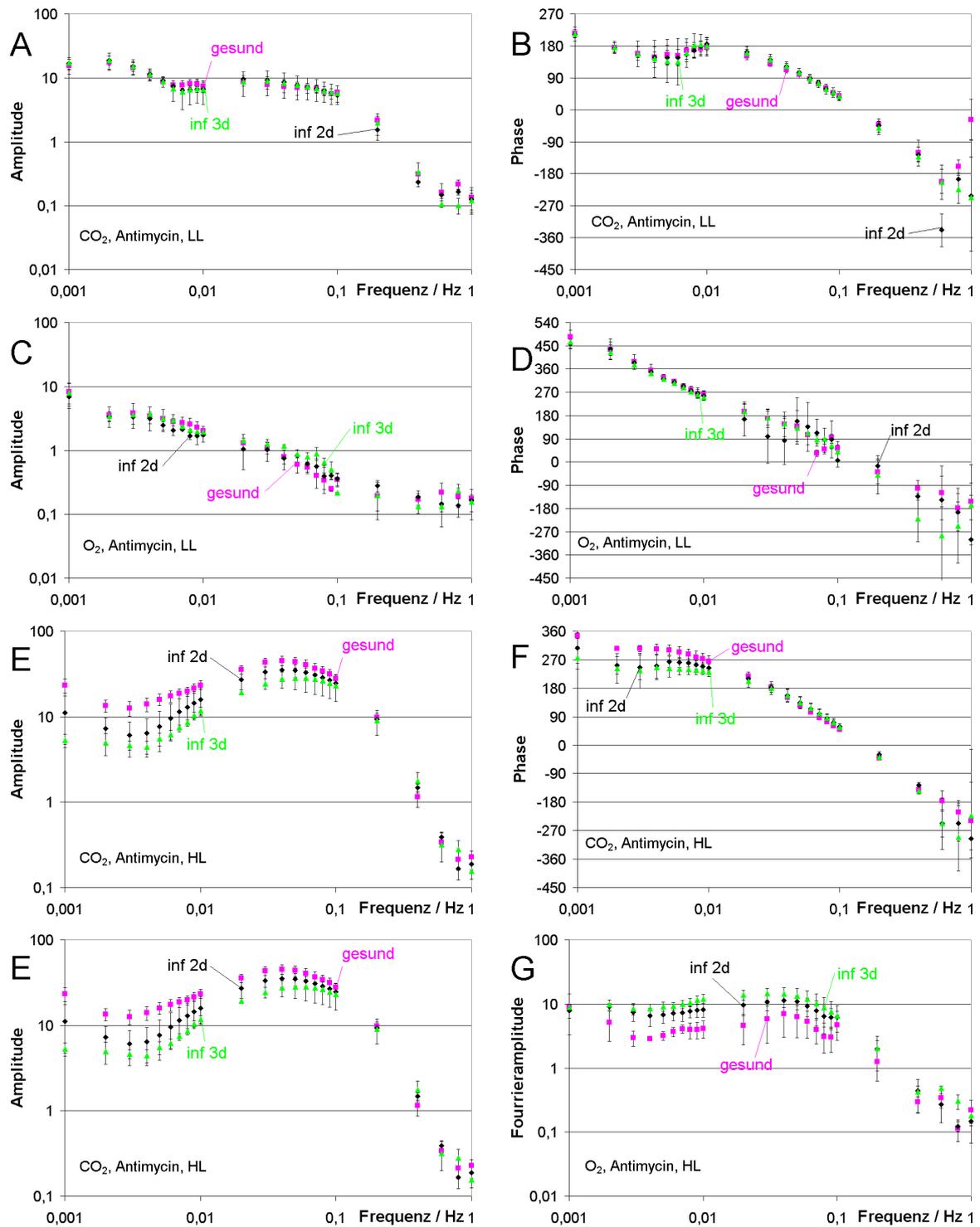


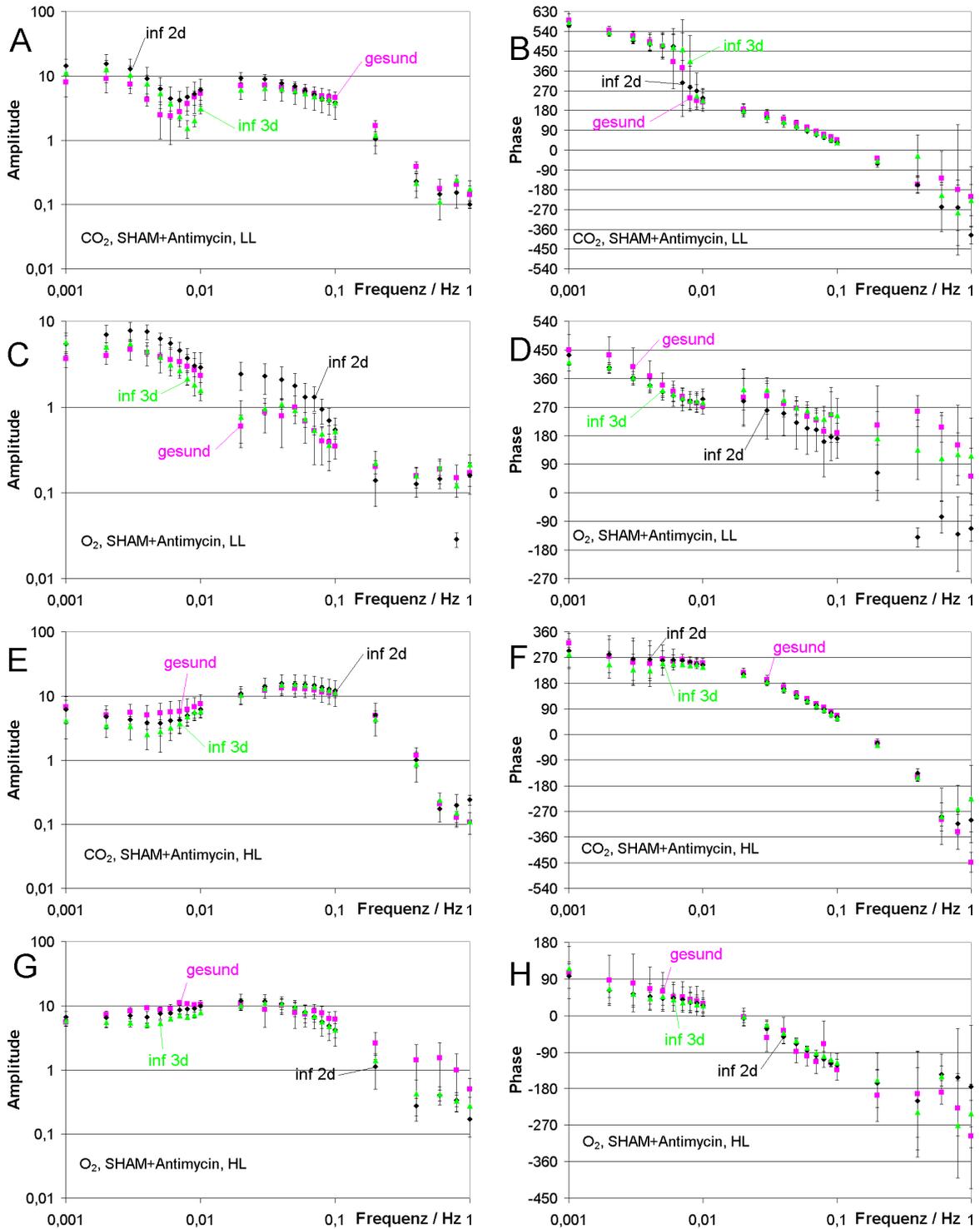
Abbildung 11.2: (A,C,E,G) Frequenz- und (B,E,F,H) Phasengang bei gesundem und vor zwei oder drei Tagen mit *Septoria tritici* infiziertem Weizen mit (A,B,E,F) CO<sub>2</sub>- oder (C,D,G,H) O<sub>2</sub>-Modulation. Mit Glyceraldehyd bei (A-D) Low-Light, (E-H) High-Light. Mittelwert über 2–3 Messungen, Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.



**Abbildung 11.3:** (A,C,E,G) Frequenz- und (B,E,F,H) Phasengang bei gesundem und vor zwei oder drei Tagen mit *Septoria tritici* infiziertem Weizen mit (A,B,E,F) CO<sub>2</sub>- oder (C,D,G,H) O<sub>2</sub>-Modulation. Mit SHAM bei (A-D) Low-Light, (E-H) High-Light. Mittelwert über 2–3 Messungen, Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.



**Abbildung 11.4:** (A,C,E,G) Frequenz- und (B,E,F,H) Phasengang bei gesundem und vor zwei oder drei Tagen mit *Septoria tritici* infiziertem Weizen mit (A,B,E,F) CO<sub>2</sub>- oder (C,D,G,H) O<sub>2</sub>-Modulation. Mit Antimycin bei (A-D) Low-Light, (E-H) High-Light. Mittelwert über 2–3 Messungen, Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.



**Abbildung 11.5:** (A,C,E,G) Frequenz- und (B,E,F,H) Phasengang bei gesundem und vor zwei oder drei Tagen mit *Septoria tritici* infiziertem Weizen mit (A,B,E,F) CO<sub>2</sub>- oder (C,D,G,H) O<sub>2</sub>-Modulation. Mit SHAM und Antimycin bei (A-D) Low-Light, (E-H) High-Light. Mittelwert über 2–3 Messungen, Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

### 11.3 Auswertung der Messungen

Die oben beschriebene Diskussion der Frequenzgänge ging von den unmittelbar sichtbaren Charakteristika in den Abb. 11.1 bis 11.5 aus. Hiermit konnten bereits wichtige Schlüsse über die Wirkungen von Inhibitoren und Infektion auf die Elektronenfluss-Verzweigung hinter PS I gezogen werden. Noch präzisere Aussagen, insbesondere auf quantitativer Basis, können erhalten werden, wenn die Frequenzgänge mit Hilfe einer Fitroutine approximiert werden.

Die Werkzeuge für eine solche quantitative Analyse der Frequenzgänge der Chlorophyll-Fluoreszenz finden sich in den Arbeiten von Hansen et al. (1991, 1993): Sinusförmige Eingangssignale ermöglichen es, mit Hilfe der Fourieranalyse den Anteil der Grundwelle im Ausgangssignal zu berechnen. Wenn man nur diese Welle für die weitere Analyse benutzt, erreicht man Linearität bis ca. 50% Modulationstiefe (Hansen et al., 1991). Aus den jeweiligen Grundwellen ergibt sich die komplexe Frequenzantwort des Blattes  $H(f)$  auf eine sinusförmige Anregung aus dem gemessenen Amplitudengang  $A(f)$  und dem Phasengang  $\varphi(f)$  (siehe auch Gleichung 4.10 im Abschnitt 4.5.3):

$$H(f) = \sqrt{\frac{A(f)^2 \tan^2 \varphi(f)}{1 + \tan^2 \varphi(f)}} + j \sqrt{\frac{A(f)^2}{1 + \tan^2 \varphi(f)}} \quad (11.1)$$

Im Falle linear(isiert)er Systeme mit diskreten Bauelementen (biochemische Reaktionen, die langsamer sind als die beteiligten Diffusionsprozesse) weiß man, dass der Frequenzgang durch eine sogenannte Transferfunktion mit den freien Parametern  $A_i$  und  $\tau_i$  angefitet werden kann:

$$F(p) = \sum_{i=1}^N \frac{A_i}{1 + p\tau_i} \quad (11.2)$$

mit  $p = 2\pi\sqrt{-1}f = j\omega$ .

Eine Aufspaltung von  $F(p)$  in Real- und Imaginärteil ergibt:

$$F(p) = \sum_{i=1}^N \frac{A_i}{1 + \omega^2\tau_i^2} - j \frac{A_i \omega\tau_i}{1 + \omega^2\tau_i^2} \quad (11.3)$$

Das Programm *fgsjfit.pas* ermöglicht mit Hilfe der Gleichung 11.3 die in die Form der Gleichung 11.1 gebrachten Frequenzgänge zu fiten. Hierbei werden jeweils Real- und Imaginärteile beim Fit getrennt verglichen (Funktion und Messpunkte), so dass die Anzahl der „Messpunkte“ doppelt so hoch ist wie die Anzahl der benutzten Frequenzen. Das Gesamtfehlerquadrat (als Optimierungsparameter) ergibt sich aus der Summe der Fehlerquadrate für die Real- und die Imaginärteile.

Der Fit liefert für jeden Frequenzgang einen Satz von  $A_i$  und  $\tau_i$  (Gleichung 11.3). Ziel ist es, mit diesen Werten die Veränderungen an den Frequenzgängen quantitativ zu beschreiben und im Rahmen eines Modells über die Umschaltung der Akzeptorwege zu erklären. Es zeigte sich aber, dass hier die Analyse mit Fitroutinen nicht zu dem gewünschten Ziel führte. Die Problematik wird an den folgenden Beispielen erläutert und mag bei der Planung zukünftiger Experimente helfen:

Nützlich wäre eine solche Analyse zum Beispiel um zu verstehen, wie die „Kerben“ in den Frequenzgängen entstehen. Eine solche Kerbe tritt zum Beispiel bei SHAM-vergifteten Blättern nach Infektion unter Low-Light auf. Abb. 11.3 zeigt Amplituden- und Phasengang eines SHAM-vergifteten, nicht infizierten Blattes. Es ist keine Kerbe zu sehen. Nach der Infektion zwei Tage zuvor tritt die Kerbe sehr deutlich im Amplitudengang auf (Abb. 11.3A). Der Phasengang, der beim nicht-infizierten Blatt noch sehr glatt ist (Abb. 11.3B), zeigt bei den infizierten einen sehr deutlichen Sprung, wie er bei Kerben aufgrund des Satzes von Bode auch auftreten muss (Bode, 1945).

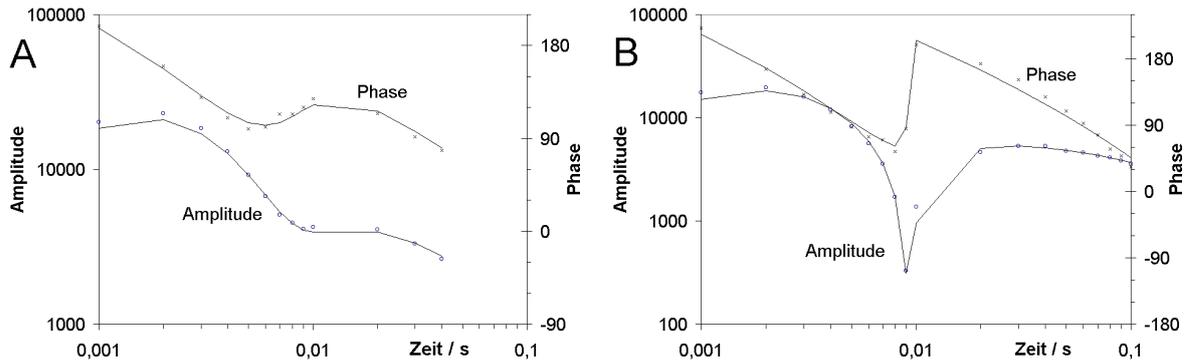
Die Tabellen 11.3 und 11.4 geben die Ergebnisse der Fits von fünf Frequenzgängen wieder, die mit zwei verschiedenen Strategien analysiert worden sind: Der Fit in Tab. 11.3 ist ein „Joint-Fit“. Hierbei wird das Programm *fgsjfit.pas* gezwungen, für alle fünf Frequenzgänge den gleichen Satz von sechs Zeitkonstanten zu benutzen. In Tab. 11.4 findet man die Ergebnisse eines partiellen Joint-Fits. Die drei hochfrequenten Zeitkonstanten  $\tau_1$  bis  $\tau_3$  sind im Joint-Fit genähert worden, die Zeitkonstanten  $\tau_4$  bis  $\tau_6$  waren frei. Frei bedeutet, jeder Frequenzgang durfte unabhängig von den anderen diese Zeitkonstanten optimieren. Beruhigenderweise sind die Mittelwerte der Zeitkonstanten  $\tau_4$  bis  $\tau_6$  aus dem freien Fit den gemeinsamen aus dem Joint-Fit sehr ähnlich.

**Tabelle 11.3:** *Ergebnisse eines Joint-Fits von fünf Frequenzgängen von SHAM-vergifteten Blättern. Die beiden ersten Spalten (gesund 1 und 2) stammen von nichtinfizierten Blättern, die dritte und vierte (inf. 2d1 und 2d2) von vor 2 Tage infizierten, und die fünfte (inf. 3d) stammt von einem Blatt, das 3 Tage vorher infiziert wurde. Die Spalte  $\tau_i$  zeigt die gemeinsamen Zeitkonstanten, die anderen fünf Spalten die zugehörigen  $A_i$ .*

$\tau_i/s$		gesund 1	gesund 2	inf. 2d1	inf. 2d2	inf. 3d
$\tau_1 = 1,6$	$A_1$	4,4	21	68,5	36,6	85
$\tau_2 = 2,2$	$A_2$	-2,3	-24	-89,7	-46,2	-116
$\tau_3 = 9,8$	$A_3$	-16	-12	19,6	1	41
	Summe $A_1 - A_3$	-13,9	-15	-1,6	-8,6	10
$\tau_4 = 25$	$A_4$	44	14	25	47	2
$\tau_5 = 68,2$	$A_5$	-124	-4	-94	-158	-83
$\tau_6 = 127,7$	$A_6$	94	4	68	130	79
	Summe $A_4 - A_6$	14	14	-1,0	19	-2
	Summe $A_5 + A_6$	-30	0	-26	-28	-4
	Summe $A_1 - A_6$	-0,1	-1	-2,6	9,4	8

**Tabelle 11.4:** *Ergebnisse eines teilweisen Joint-Fits der fünf Frequenzgänge in Tab. 11.3 von SHAM-vergifteten Blättern. Die beiden ersten Spalten (gesund 1 und 2) stammen von nichtinfizierten Blättern (der Fit für gesund 1 ist in Abb. 11.6A dargestellt), die dritte und vierte (inf. 2d1 und 2d2) von vor 2 Tage infizierten (Abb. 11.6B zeigt inf. 2d2), und die fünfte (inf. 3d) stammt von einem Blatt, das 3 Tage zuvor infiziert wurde. Die Spalte  $\tau_i$  zeigt für  $\tau_1$  bis  $\tau_3$  die gemeinsamen Zeitkonstanten (Joint) und für  $\tau_4$  bis  $\tau_6$  die Mittelwerte (nicht im Joint-Modus) der Zeitkonstanten, welche einzeln in den letzten drei Zeilen dargestellt sind. Die anderen fünf Spalten zeigen die zugehörigen  $A_i$ .*

$\tau_i/s$		gesund 1	gesund 2	inf. 2d1	inf. 2d2	inf. 3d
$\tau_1 = 1,4$	$A_1$	2,3	12,7	63	23,7	57
$\tau_2 = 2,1$	$A_2$	0,3	-12	-84,9	-27,6	-83
$\tau_3 = 9,1$	$A_3$	-12,2	-27,6	20,6	-16,5	31
	Summe $A_1 - A_3$	-9,6	-26,9	-1,3	-20,4	5
$\tau_4 = 26,92$	$A_4$	91	20	27,5	78,2	9,3
$\tau_5 = 70,35$	$A_5$	-201	3,4	-127	-135	-136
$\tau_6 = 111,25$	$A_6$	156	1,4	102	78,4	131
	Summe $A_4 - A_6$	46	24,8	2,5	21,6	4,3
	$\tau_1/s$	38	13,5	32,5	23,9	26,7
	$\tau_2/s$	65	50,8	85,7	52,8	75,7
	$\tau_3/s$	112,5	115,8	141,4	115	110



**Abbildung 11.6:** Amplituden- (linke y-Achse) und Phasengang (rechte y-Achse) zweier Frequenzgänge aus Abb. 11.3A,B (Punkte bzw. Kreuze) zusammen mit der mit der Gleichung 11.3 gefitteten Kurve und den Parametern aus Tabelle 11.4 (durchgezogene Linien). (A) gesundes Weizenblatt ohne Kerbe im Frequenzgang, (B) zwei Tage zuvor infiziertes Weizenblatt mit Kerbe.

Aussagen kann man aus dem Verhalten der Amplitudenfaktoren gewinnen: Die Erwartung war eigentlich, dass man erkennen könnte, wie die Kerbe in Abb. 11.6B durch eine charakteristische Änderung von einem oder zwei der Amplitudenfaktoren entstände. Die Werte der  $A_i$  in beiden Tabellen lassen aber keine Gesetzmäßigkeit erkennen, die mit dem Auftreten der Kerbe in Verbindung gebracht werden könnte. Die ersten beiden Datensätze stammen von zwei gesunden Blättern ohne Kerbe wie in Abb. 11.6A, die anderen drei von infizierten Blättern mit Kerbe (Abb. 11.6B). Die Kerbe tritt auf, wenn die Phasen- und Amplituden der beteiligten Wege solche Werte annehmen, dass die zugehörigen Signale aus diesen Wegen sich gerade aufheben. Diese Wege sind (wie schon in Kapitel 6 genannt) der photochemische Fluss mit den Zeitkonstanten  $\tau_1$  bis  $\tau_3$ , die Membran-Energetisierung mit der Zeitkonstante  $\tau_4$  und nicht identifizierte Wege mit den Zeitkonstanten  $\tau_5$  und  $\tau_6$ .

Die 4. Datenzeile in den Tabellen enthält die Summe der Komponenten 1 bis 3 und die 8. Datenzeile die Summe der Komponenten 4 bis 6. Erstaunlicherweise lässt sich weder in den Amplitudenfaktoren der Einzelwege noch in den zusammengefassten Koeffizienten noch im Quotienten der Wege untereinander etwas feststellen, was zwischen den Frequenzgängen mit und ohne Kerbe charakteristisch verschieden wäre. Offenbar ist bei vier Wegen die Auswahl an Möglichkeiten, die eine Kerbe zu erzeugen, so vielfältig, dass ein klares Schema nicht erkennbar ist. Es muss aber charakteristische Unterschiede geben, denn nur die infizierten Pflanzen haben eine Kerbe.

Möglicherweise ist die Variabilität der Fits auch zu groß, denn die gebrochen rationalen Funktionen der Gleichung 11.3 bilden kein Orthogonalsystem. Beim Fitten mit nicht-orthogonalen Systemen kann ein Fehler in einer Komponente durch Fehler in den anderen wieder ausgeglichen werden. Eine Weiterführung dieser Analyse, die die gewünschte Rückführung der beobachteten Änderungen auf bestimmte Stoffwechselwege (bestimmte Amplitudenfaktoren in Tab. 11.3 und 11.4) erreichen könnte, sollte folgende Methoden einsetzen:

**Joint-Fit mit Frequenzgängen von anderen Ausgangssignalen:** Solche Signale könnten sein:

- Scattering-Messungen bei 535 nm (S535 für die Thylakoiden-Energetisierung, also  $\tau_4$ ),
- Absorptionsmessungen bei 820 nm (Redox-Zustand von PS I),
- photoakustische Signale ( $O_2$ -Bilanz-Störung durch die Mehlerreaktion, Stroma-Ansäuerung, Tabrizi et al., 1998),
- elektrische Membranspannung (Vanselow et al., 1989).

Die Kombination verschiedener Ausgangssignale, in denen die einzelnen Komponenten der Gleichung 11.3 mit anderen Amplitudenfaktoren auftreten, erwies sich als sehr effektives Mittel, die Aussagekraft von Fits zu erhöhen (Vanselow et al., 1989). Die Besonderheiten des Weizenblattes hätten allerdings für die Messung dieser Signale die Entwicklung einer verbesserten Messtechnik erfordert, für die der Zeitrahmen nicht ausreichte.

**Entwicklung eines Target-Fits:** Ein Target-Fit zielt auf die Bestimmung von Größen, die in möglichst unmittelbarem Zusammenhang zu den biophysikalischen Prozessen stehen. Im Fall der hier interessierenden Analyse der Verzweigung der PS-I-Akzeptorwege sind die Ratenkonstanten der Übergabe von Redox-Äquivalenten in der ETC und von PS I auf die verschiedenen Akzeptoren das Target. Ein solcher Ansatz war bereits von Gebh (1996) versucht worden, erreichte aber noch keine volle Anwendungsreife. Die Entwicklung eines Target-Fits für die hier gemessenen FC-Frequenzgänge ist wahrscheinlich einfacher als für normale mit dem PAM gemessene Chlorophyll-Fluoreszenz-Frequenzgänge, da der FC-Regelkreis die nicht-lineare Verkopplung von photochemischem Fluss und thermischer Deaktivierung in der Antenne aufhebt und in eine lineare Überlagerung verwandelt.

Ein Target-Fit könnte aus folgenden Gründen bessere Ergebnisse liefern: Angenommen, die Infektion würde nur eine Ratenkonstante ändern, dann könnten in einem Joint-Fit die anderen Ratenkonstanten als unbeeinflusst angenommen werden. Das ist beim Fit nach Gleichung 11.3 wahrscheinlich nicht möglich, weil eine einzelne Ratenkonstante aufgrund der zugehörigen gekoppelten Differentialgleichungen mehrere Zeitkonstanten und Amplitudenfaktoren beeinflussen kann. Im Falle der Analyse von Patch-Clamp-Daten zum Schaltverhalten von Ionenkanälen hat sich der Target-Fit dem Zeitkonstantenfit (Gleichung 11.3) als weit überlegen erwiesen (Albertsen und Hansen, 1994; Blunck et al., 1998; Schröder et al., 2005) Insofern sollte eine Fortführung der in den Tabellen 11.3 und 11.4 nicht sehr erfolgreich erscheinenden Analysen erst dann durchgeführt werden, wenn ein Target-Fit für den Elektronenfluss in den Chloroplasten erstellt worden ist. Da hierzu eine sehr schwierige Modellerstellung gehört, ist dies ein Thema für eine eigenständige Arbeit.



# Kapitel 12

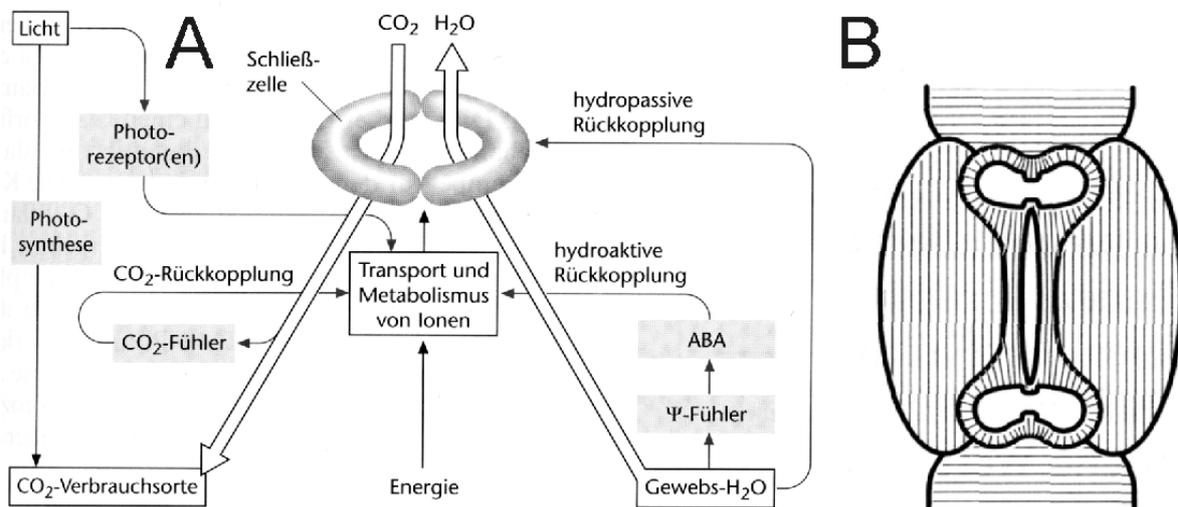
## Messungen an Stomata

Der Befund einer unterschiedlichen Photorespirationsrate bei gesunden und infizierten Blättern (siehe Kapitel 10) legte die Vermutung nahe, dass die Pflanze durch Öffnen oder Schließen der Spaltöffnungen die Gaskonzentration dahingehend regeln kann, dass sich das Verhältnis von  $O_2$  zu  $CO_2$  zu ersterem hin verschiebt, was eine verstärkte Photorespiration ermöglicht.

In Zusammenarbeit mit Dr. Hartmut Kaiser aus der Abteilung „Ökophysiologie der Pflanzen“ des Botanischen Instituts der Kieler Universität konnten entsprechende Messungen an Stomata durchgeführt werden.

### 12.1 Spaltöffnungen

Aufgrund der verdunstungsverhindernden Undurchlässigkeit der Wachsschicht der Blätter findet keine Diffusion durch die Außenhaut des Blattes statt. Deshalb verfügt die Pflanze über Spaltöffnungen (Stomata). Da durch diese aber viel Wasserdampf entweicht (ca. 500–2000 Moleküle  $H_2O$  pro fixiertem  $CO_2$ -Molekül, Sitte et al., 2002), dürfen diese Öffnungen nur bei guter Wasserversorgung geöffnet sein (Kaiser, 1999).



**Abbildung 12.1:** (A) Schema des Rückkopplungssystems der Stomata.  $\Psi$ , Wasserpotential; ABA, Abscisinsäure. (B) Schematische Darstellung einer Schließzelle, wie sie in Weizen zu finden ist. Beides nach Sitte et al. (2002).

Die Abbildung 12.1A zeigt einige der funktionalen Zusammenhänge, die zu den Regelkreisen gehören, die sich auf den Öffnungsgrad der Stomata auswirken, z.B. :

- *CO<sub>2</sub>-Konzentration*: Photosyntheseaktivität erniedrigt den  $CO_2$ -Gehalt und geöffnete Spalte erhöhen ihn.

- *Wassergehalt*: Da die Hauptaufgabe der Spaltöffnungen ist, den Wassergehalt zu regulieren, ist er eine Signalgröße für die Einstellung des Öffnungsgrades.
- *Blaues Licht* wirkt schon bei geringen Intensitäten über einen Blaulichtrezeptor öffnend auf die Stomata.

**Funktionsweise:** Abbildung 12.1B zeigt schematisch den Querschnitt durch eine Spaltöffnung des Typs, wie er bei Weizen zu finden ist. Die Größe des Spaltes in der Mitte wird dadurch geändert, dass sich der Zellturgor in den keulenförmig aufgetriebenen Enden ändert. Dadurch vergrößern oder verkleinern diese ihr Volumen. Die Cellulose-Mikrofibrillen (dünne Linien) verleihen der Zelle in den Längsbereichen Starrheit. Wenn nun die runden Enden ihr Volumen vergrößern, verschieben sich die Ränder parallel auseinander und öffnen damit den Spalt.

Der Turgor wird über das osmotische Potential bestimmt, welches die Triebkraft für den Ein- oder Ausstrom von Wasser liefert. Die Einstellung des osmotischen Potentials geschieht hauptsächlich durch Malat-,  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -Ionen. Weitere Details, die für das Verständnis dieses Kapitels aber nicht nötig sind, finden sich bei Sitte et al. (2002) oder bei Kaiser (1999).

## 12.2 Messaufbau und Ablauf

Im Wesentlichen besteht die Anlage zur Bestimmung der Stomata-Öffnungen aus zwei Komponenten:

1. Gaswechsellanlage, mit deren Hilfe die  $\text{CO}_2$ -Absorption (Netto-Photosynthese) und die stomatare Leitfähigkeit (Transpiration) bestimmt werden können,
2. Mikroskop mit Kamera, welche die Photos von Blattstücken ermöglichen, auf denen dann die Spaltflächen, also die Öffnungsflächen der Stomata vermessen werden können.

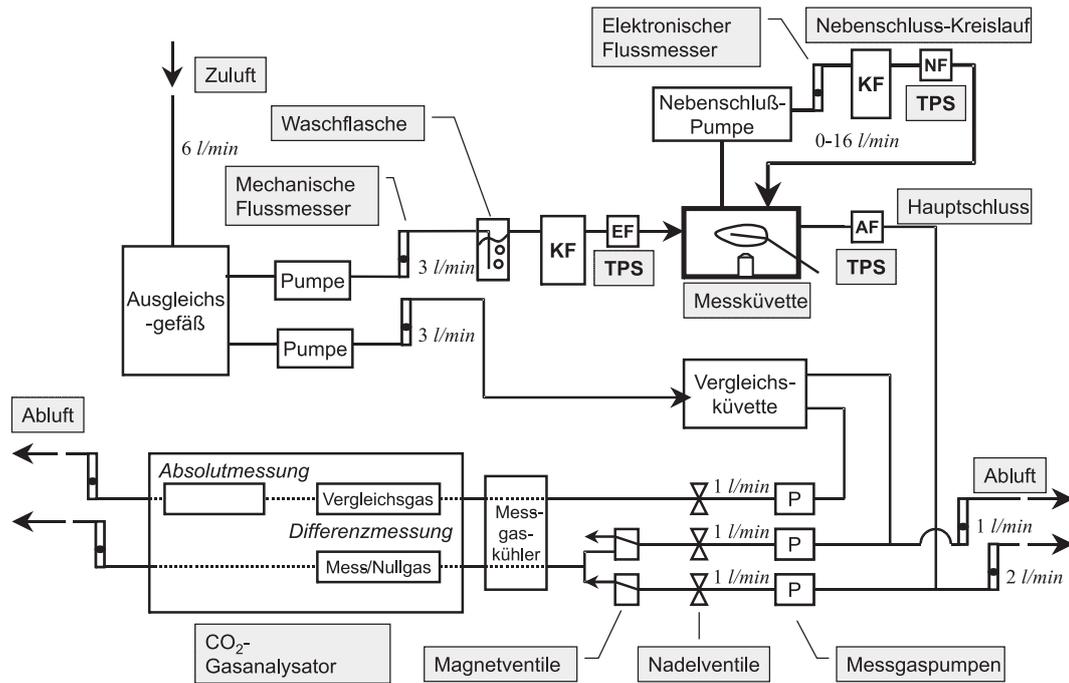
### 12.2.1 Gaswechsellanlage

Die Gaswechsellanlage (siehe Abbildung 12.2) entspricht weitestgehend der, welche bereits in Kaiser (1999) beschrieben wurde:

Das Weizenblatt wird durch ein gegen Gasein- und -ausstrom abgedichtetes Loch in die Messküvette geführt und von oben mit einer regelbaren Lichtquelle beleuchtet. Unter dem Blatt befindet sich ein Mikroskop (Beschreibung im Abschnitt 12.2.4). Das System zur Messung der Blatt-Transpiration und der  $\text{CO}_2$ -Aufnahme ist in der Abbildung 12.2 gezeigt. Die angesaugte Zuluft wird in zwei Wege geteilt: Der eine Luftstrom passiert die Küvette mit dem Blatt. Der Vergleichsstrom durchströmt eine leere Küvette gleichen Volumens. Ein Infrarot- $\text{CO}_2$ -Analysator (Binos 2, Leybold Heraeus, Hanau) bestimmt dann die Differenz der  $\text{CO}_2$ -Gehalte zwischen den beiden Gasströmen über Infrarot-Absorptionsmessung.

Zwei Kältefallen (KF, Abb. 12.2) und drei peltiergekühlte Taupunktspiegel (TPS) dienen der Einstellung der Soll-Luftfeuchte und der Transpirationsmessung. Die einströmende Umgebungsluft wird in der Waschflasche mit Wasserdampf gesättigt. Die Temperatur der ersten Kältefalle wird auf den Taupunkt der gewünschten Feuchte eingestellt und damit überschüssiges Wasser entfernt. Der erste Taupunktspiegel misst dann die Eingangsfeuchte (EF). Hinter der Messküvette dient ein zweiter Taupunktspiegel der Messung der Ausgangsfeuchte (AF).

Prinzipiell würde dieses System die Transpiration des Blattes schon messen können, da sich eine Differenz zwischen Ausgangs- und Eingangsfeuchte ergibt. Allerdings würden sich dann auch die Messbedingungen ändern, da die Pflanze eine höhere Umgebungsluftfeuchte vorfindet als vorgegeben. Um dies zu vermeiden, entfernt der Nebenschluss-Kreislauf (siehe Abb. 12.2) die von der Pflanze abgegebene Transpirationsfeuchte wieder aus dem Kreislauf. Zu diesem Zweck scheidet die zusätzliche Kältefalle, die auf einen niedrigeren Taupunkt als die erste eingestellt



**Abbildung 12.2:** Schematische Darstellung der Gasmessanlage für die Messung an Stomata. Abkürzungen: KF = Kältefalle, TPS = Taupunktspiegel, EF = Eingangsfeuchte, NF = Nebenseuchte, AF = Ausgangsfeuchte. Typische Flussraten der Gaswege sind eingetragen. Funktionsbeschreibung siehe Text. Unter der Messküvette befindet sich ein Mikroskop mit Videokamera (nicht eingezeichnet).

ist, das Wasser aus der Luft. Geregelt wird dieser Weg über die Flussrate, die in Abhängigkeit der Differenz von Aus- und Eingangsfeuchte eingestellt wird.

## 12.2.2 Berechnung der Transpiration und stomatären Leitfähigkeit

In diesem Abschnitt wird die Berechnung der Blatt-Transpiration aus den Messdaten der Taupunktspiegel und den Flussraten aufgezeigt, die Detailrechnungen finden sich bei Kaiser (1999).

Aus der Taupunkttemperatur, welche mit Hilfe der Taupunktspiegel gemessen wird, ergibt sich über die Goff-Gratch-Gleichung der Sättigungsdampfdruck  $v_{sat}(T)$  des Wassers und daraus die molare Wasserkonzentration in der Luft:

$$\omega_{sat} = \frac{v_{sat}(T)}{P} \quad (12.1)$$

Dabei ist  $P$  der Luftdruck.

Die Differenz der molaren Wasserdampfkonzentrationen im Haupt- und Nebenweg ergibt zusammen mit den jeweiligen Flussraten und der Blattfläche die Transpirationsrate  $E$ :

$$E = \frac{(\omega_a - \omega_n)u_N + (\omega_a - \omega_e)u_H}{L_a} \quad (12.2)$$

- mit  $\omega_a$ : molare Wasserdampfkonzentration am Küvettenausgang
- $\omega_n$ : molare Wasserdampfkonzentration am Nebenwegausgang
- $\omega_e$ : molare Wasserdampfkonzentration am Küvetteneingang
- $u_N$ : Fluss durch den Nebenweg
- $u_H$ : Fluss durch den Hauptweg
- $L_a$ : einseitige Blattfläche

Die Blattfläche wurde ermittelt, indem das Blatt eingescannt und mit der Bildanalysesoftware SigmaScan (SPSS Inc.) die Fläche bestimmt wurde.

Die Blattleitfähigkeit ergibt sich dann im ersten Ansatz aus der Transpiration und der Differenz  $\Delta w$  der molaren Wasserdampfkonzentration in den Blattinterzellularen und der freien Atmosphäre:

$$g_L = \frac{E}{\Delta w} \quad (12.3)$$

Daraus berechnet sich unter Zuhilfenahme eines Korrekturterms für die Interaktion der unterschiedlichen Gasmoleküle (Ball, 1987) die stomatäre Leitfähigkeit  $g$ , was hier aber nicht im Detail vorgeführt werden soll, sondern bei Kaiser (1999) nachzulesen ist.

### 12.2.3 Berechnung der Photosynthese-Rate

Mit dem oben genannten Infrarot-Absorptionsmessgerät wird die Differenz der  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen zwischen dem Gasstrom, der durch die Messküvette geleitet wurde, und dem, der durch die leere Vergleichsküvette geströmt ist, bestimmt (Koch et al., 1968). Die Nettphotosyntheserate  $A$  (netto  $\text{CO}_2$ -Fixierung) ergibt sich dann zu:

$$A = \frac{\Delta \text{CO}_2 \cdot u_H}{L_a} \quad (12.4)$$

mit  $\Delta \text{CO}_2$ :  $\text{CO}_2$ -Differenz Mess- und Vergleichsküvette  
 $u_H$ : Fluss durch den Hauptweg  
 $L_a$ : Einseitige Blattfläche

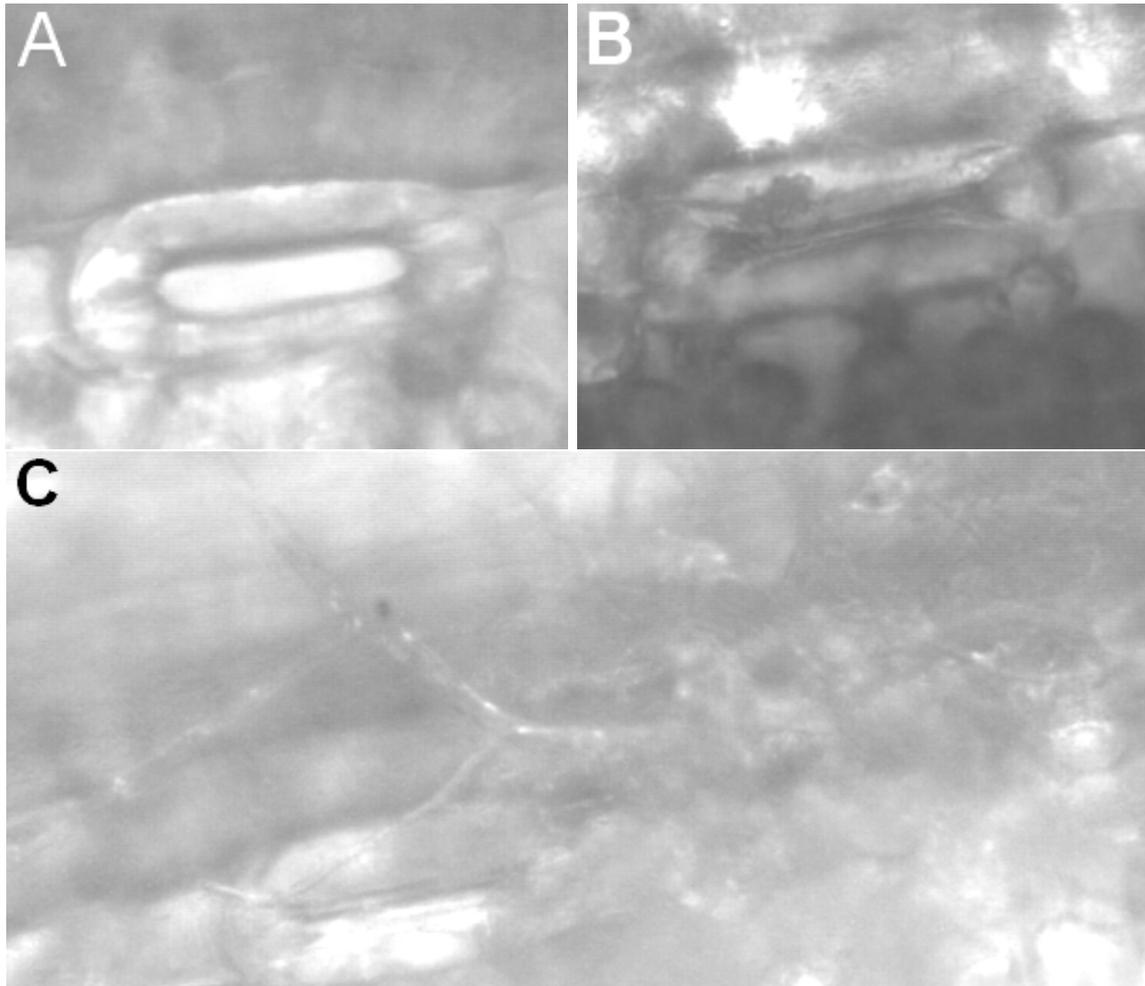
### 12.2.4 Mikroskop

Neben den Gas- und Transpirationmessungen bot die Anlage die oben genannte Möglichkeit, den Öffnungsgrad der Stomata optisch zu bestimmen. Unterhalb der Messküvette (siehe Abbildung 12.2) befindet sich ein Mikroskop auf einem vom Computer gesteuerten xy-Tisch, die Bilder nimmt eine CCD-Kamera auf. Eine passende Software wählt nach einem Zufallsverfahren 25 Punkte auf dem Blatt aus. Von diesen Punkten ausgehend werden unter visueller Kontrolle Stomata ausgesucht und davon Bilder aufgenommen und gespeichert (Vergrößerung: ca. 50-fach). Mit einem weiteren Programm kann dann in diesen Bildern die Spaltfläche der Spaltöffnungen bestimmt werden, indem der Umriss auf dem vorher aufgenommenen Stomata-Bild als Polygon mit einer Maus markiert wird. Die Software berechnet die vom Polygon umrandete Fläche. Die Abbildung 12.3 zeigt drei verschiedene Spaltöffnungen eines Weizenblattes.

### 12.2.5 Messablauf und Datenauswertung

Die Blätter wurden einzeln in die Messküvette eingelegt (je eins pro Tag), wobei sie mit der Pflanze verbunden blieben und auf diese Weise mit Wasser versorgt wurden. Die Luftfeuchte in der Küvette wurde in einer Messreihe auf 85% und in der anderen auf 50% eingestellt, das Licht hatte eine Intensität von ca.  $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bei einer Tageslänge von 14 Stunden. 24 Stunden nach Einbau des Blattes, wenn genügend Zeit zur Anpassung an die Umweltbedingungen verstrichen war, erfolgte die Aufnahme der Bilder für 25 Stomata je Blatt. Im Anschluss an die Bildaufnahme wurde das Blatt aus der Messkammer entfernt und seine Fläche bestimmt. Während das Blatt in der Küvette war, wurden die Transpiration und Photosyntheserate kontinuierlich gemessen und im Abstand von einer Minute von einem Datalogger aufgezeichnet.

Aus den aufgezeichneten Daten wurden die Werte bestimmt, die zur Zeit der Bildaufnahme vorherrschten (10 Messpunkte), und daraus mit Hilfe der gescannten Blattfläche die stomatären Leitfähigkeiten und die Nettphotosyntheseraten bestimmt. Über die 10 Messpunkte wurde dann gemittelt und die Standardabweichung als Maß für die Konstanz der Messung errechnet. Die Flächen der 25 Stomata vom selben Blatt wurden ebenfalls gemittelt.



**Abbildung 12.3:** Stomata-Aufnahmen von einem Weizenblatt: A: offen, B: geschlossen, C: Stomatum mit Pilzhypfen, 2 Tage nach Infektion mit *Septoria tritici*, vergl. Abbildung 4.3 im Abschnitt 4.2.

### 12.2.6 Verwendete Pflanzen und Infektion

Der verwendete Weizen war zum Zeitpunkt der Messung ca. 1,5 Monate alt. Die Infektion mit *Septoria tritici* wurde, wie im Abschnitt 4.2.3 beschrieben, im ZBM durchgeführt. Die gut sichtbaren Hyphen in der Abbildung 12.3 zeigen, dass die Infektion auch erfolgreich war.

Die Messungen erfolgten im folgenden Zeitschema:

Tag	Einbau	Infektion	Messung
1	Kontrolle 1		
2	Kontrolle 2	Inf 1, 2, 3	Kontrolle 1
3	Inf 1 (1 Tag alt)		Kontrolle 2
4	Inf 2 (2 Tag alt)		Inf 1
5	Inf 3 (3 Tag alt)		Inf 2
6			Inf 3

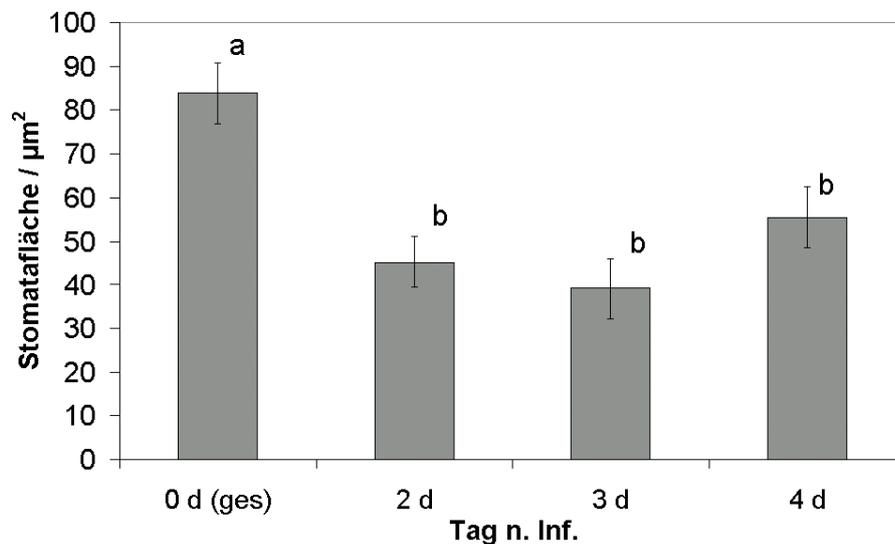
Eine Messung an Tag 1 nach Infektion war nicht möglich, weil dies einen Einbau in die Apparatur direkt nach der Infektion bedeutet hätte, die aber erst Zeit zum „Wirken“ benötigte.

## 12.3 Ergebnisse

### 12.3.1 Messung unter 50% Luftfeuchte

Die Messungen fanden bei einer eingestellten Feuchte von 50% statt. Diese Luftfeuchtigkeit wird in dieser Arbeit zum Teil als „normal“ bezeichnet, weil in der Gaswechsellanlage (siehe Abschnitt 4.5.2, sowie Kapitel 9 bis 11 und 13) die Luft wegen des verwendeten Gases aus Druckflaschen relativ trocken war. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurde deshalb dieser Feuchtigkeitswert gewählt.

Bei gesunden und mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern wurde wie oben beschrieben die Spaltfläche der Stomata, die Nettophotosyntheserate und die stomatäre Leitfähigkeit bestimmt. Die Abbildungen 12.4 und 12.5 zeigen die zugehörigen Mittelwerte, aufgetragen über den Tagen nach Infektion.

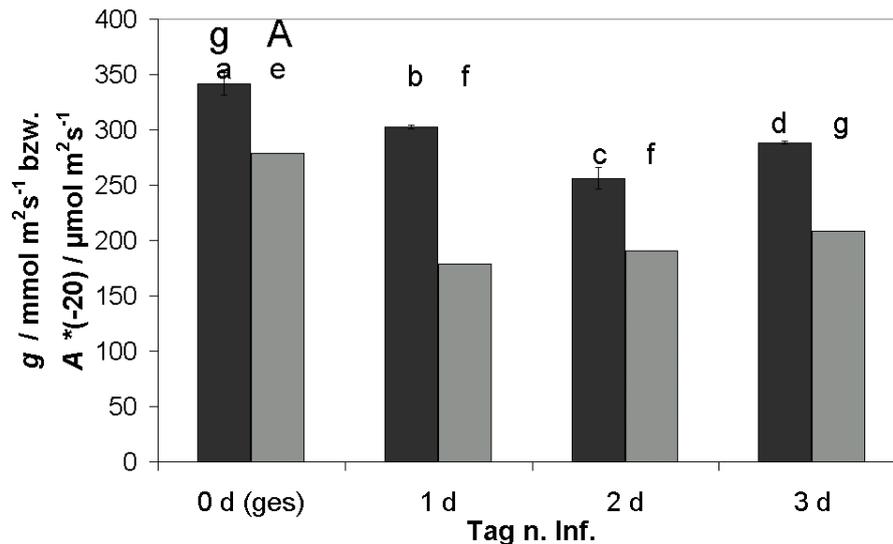


**Abbildung 12.4:** Messung Spaltfläche der Stomata bei gesunden (Tag 0) und mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern an den Tagen 2 – 4 nach Infektion bei 50% Luftfeuchte. Mittelwert über je 25 Spaltöffnungen. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Der Mittelwert vom Tag 0 (gesund) ist signifikant verschieden von den Werten der infizierten Blätter ( $p=0.05$ ), was durch unterschiedliche Buchstaben markiert ist.

Die Stomata (Abb. 12.4) sind bei den gesunden Blättern deutlich weiter geöffnet als bei den infizierten, der Unterschied ist statistisch signifikant ( $p=0.05$ ). Am vierten Tag sind sie wieder etwas weiter offen als am zweiten und dritten Tag, allerdings noch immer deutlich weiter geschlossen als bei gesunden Blättern.

Bei der Messung der Nettophotosyntheserate (Abb. 12.5) ist das Verhalten analog zu den Offenflächen der Stomata: gesunde und infizierte unterscheiden sich deutlich. Die Streuung der Messdaten über den 10-minütigen Erfassungszeitraum ist dabei so klein, dass diese Unterschiede signifikant sind ( $p=0.05$ ). Auch die stomatäre Leitfähigkeit zeigt ein ähnliches Verhalten mit einer Abnahme bei den infizierten Blättern.

Die Stomata sind also bei mit *Septoria tritici* infizierten Pflanzen deutlich weiter geschlossen. Die Messungen der Nettophotosyntheserate und der stomatären Leitfähigkeit zeigen ein ähnliches Verhalten. Daraus kann man schließen, dass der Stomataschluss ausreicht, um die Photosynthese zu beeinflussen, indem der  $\text{CO}_2$ -Gehalt reduziert wird und damit die RubisCO von Carboxylierung auf Oxygenierung umschaltet.



**Abbildung 12.5:** Messung der stomatären Leitfähigkeit  $g$  und der Nettophotosyntheserate  $A$  bei gesunden (Tag 0) und mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern an den Tagen 2 – 4 nach Infektion bei 50% Luftfeuchte. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung für das Messintervall an (10 min, eine Messung pro Minute). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikant verschiedene Mittelwerte ( $p=0.05$ ).  $A$  ist der besseren Übersicht halber mit  $-20$  multipliziert dargestellt ( $\text{CO}_2$ -Aufnahme wird sonst als negativ gerechnet).

### 12.3.2 Messung unter hoher Luftfeuchte

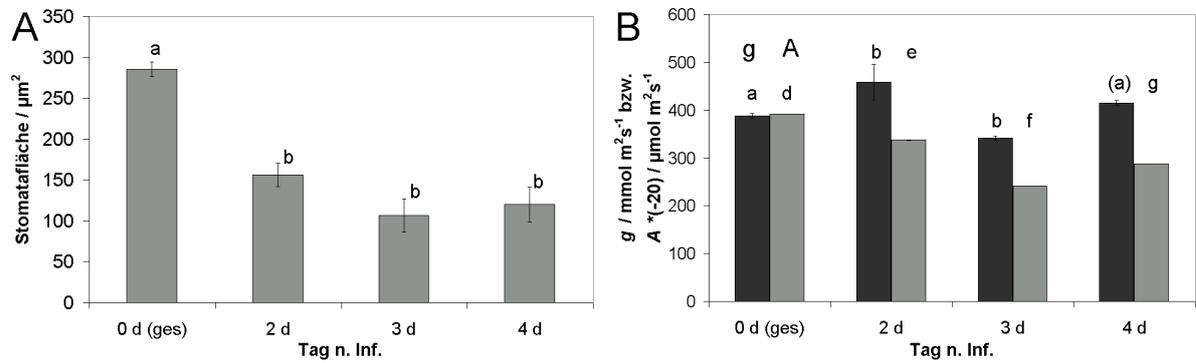
Im Gegensatz zu den Messungen aus dem vorigen Abschnitt fanden folgende bei einer hohen Luftfeuchte von 85% statt. Die zugehörigen Messergebnisse zu den Spaltflächen der Stomata, der Nettophotosyntheserate und der Transpiration finden sich in der Abbildung 12.6.

Abbildung 12.6A zeigt, dass die Stomata um den Faktor drei weiter geöffnet sind als bei der niedrigeren Luftfeuchte in Abbildung 12.4, was aber auch erwartet wurde, da bei höherer Luftfeuchte die Spaltöffnungen sich vergrößern. Auch bei hoher Feuchte zeigt sich das gleiche Infektionsbild: Die Stomata von gesunden Blättern sind deutlich weiter offen als bei den infizierten, auch hier ist der Unterschied signifikant ( $p=0.001$ ).

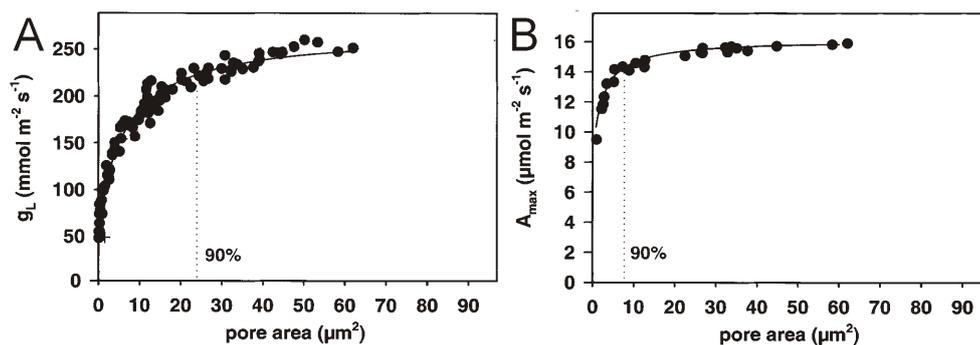
Bei der Nettophotosyntheserate (Abb. 12.6B) ist dies ähnlich: Die Rate ist höher als bei der „normalen“ Luftfeuchte (Abb. 12.5), allerdings ist der Zuwachs nicht so deutlich wie bei den Stomata-Offenflächen. Auch hier bei dem Wert für  $A$  zeigt sich das Bild, dass die Infektion eine Reduktion gegenüber den gesunden Blättern bringt.

Überraschend ist das Ergebnis bei der stomatären Leitfähigkeit: Diese ist nur am Tag 3 nach der Infektion gegenüber der Kontrolle reduziert, am zweiten und vierten Tag zeigt sich sogar eine Steigerung (Abb. 12.6B).

Prinzipiell ist die mangelnde Kopplung zwischen Öffnungsgrad und stomatärer Leitfähigkeit keine Überraschung. Kaiser und Kappen (2001) zeigten für Holunder, dass die stomatäre Leitfähigkeit ( $g_L$ ) und die Nettophotosyntheserate ( $A$ ) erst bei sehr fortgeschrittener Schließung absinken (Abb. 12.7), also über einen weiten Bereich vom Öffnungsgrad unabhängig sind. Nach Abb. 12.7 wäre die Unabhängigkeit vom Öffnungsgrad aber eher bei der Photosyntheserate zu erwarten gewesen im Gegensatz zu Abb. 12.6B. Diese Frage ist hier nicht zu lösen. Für die vorliegende Arbeit ist die stomatäre Leitfähigkeit von geringem Interesse. Die Abnahme Netto-Photosyntheserate zusammen mit dem bei Infektion unveränderten photochemischen Fluss aus Abb. 5.2 ist zusammen mit dem verminderten Stomata-Öffnungsgrad das Ergebnis, welches eine kausale Begründung für den Schluss aus den Gassprungantworten (Kapitel 10) liefert, nämlich dass bei Infektion die Photorespiration erhöht wird.



**Abbildung 12.6:** Messung (A) der Spaltflächen der Stomata und (B) der stomatären Leitfähigkeit  $g$  und der Nettphotosyntheserate  $A$  bei gesunden (Tag 0) und mit *Septoria tritici* Weizenblättern infizierten Weizenblättern an den Tagen 2 – 4 nach Infektion bei hoher Luftfeuchte (85%). (A) Mittelwert über je 25 Spaltöffnungen, die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Der Mittelwert vom Tag 0 (gesund) ist signifikant verschieden von den Werten der infizierten Blätter ( $p=0.001$ ). (B) Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung für das Messintervall (10 min) an. Alle Werte für  $g$  und  $A$  sind untereinander signifikant verschieden ( $p=0.001$ , bei  $g$  und Tag 0 und 4 nur  $p=0.05$ ).  $A$  ist der besseren Übersicht halber mit  $-20$  multipliziert ( $\text{CO}_2$ -Aufnahme wird sonst als negativ gerechnet).



**Abbildung 12.7:** Der Zusammenhang zwischen (A) Stomata-Leitfähigkeit und (B) Nettphotosynthese und der Fläche der Stomata-Poren. Mittelwerte über jeweils die gleichen 15 Spaltöffnungen an verschiedenen Zeit der Öffnung nach Einschalten des Lichtes. Die gestrichelten Linien markieren die mittlere Spaltfläche, bei der die Leitfähigkeit bzw. die Nettorate auf 90% gestiegen ist. Messungen an Holunder (*Sambucus nigra*) aus Kaiser und Kappen (2001).

## Kapitel 13

# Windeinflüsse auf die CO<sub>2</sub>-Versorgung

Neben den Gassprung- und Frequenzgang-Messungen wurden Experimente zur Luftverwirbelung über den Stomata durchgeführt. Die Versuche bauten auf Arbeiten von Frau Dr. Maiko Abshagen aus der eigenen Arbeitsgruppe auf. Sie hatte ein „Schnüffelmikroskop“ gebaut, d. h., sie benutzte eine ausgezogene Glaskapillare, wie sie bei Patch-Clamp-Messungen Verwendung findet, vor dem Einlassrohr eines Massenspektrometers und fuhr damit eine Blattoberfläche ab, um sich die CO<sub>2</sub>- und Wasserprofile über den Stomata-Öffnungen anzusehen. Sie fand eine Absenkung der CO<sub>2</sub>-Konzentration teilweise um 100 ppm über der Spaltöffnung. Diese Beobachtungen sind auch für die Messungen im Feld interessant, da der Wind diese Trichter über den Spaltöffnungen verwirbelt.

### 13.1 Versuchsaufbau und Messablauf

Die Messungen fanden mit der im Abschnitt 4.5.2 (S. 42) beschriebenen Gasflussanlage statt. Diese wurde etwas abgewandelt, da die Konfiguration in der Abb. 4.13 nur die Veränderung der Gaskonzentration, nicht aber ein schnelles Ein- und Ausschalten aller drei Gassorten erlaubt. Deshalb wurde zwischen die Gasmischkammer und die Messkammer ein Ventil eingebaut, welches die Umschaltung des Gasstromes zwischen Kammer und Umgebung (damit der Fluss gleichmäßig weitergeht) ermöglichte. Das Ventil wurde ebenfalls von der im Abschnitt 4.5.3 beschriebenen Software angesteuert.

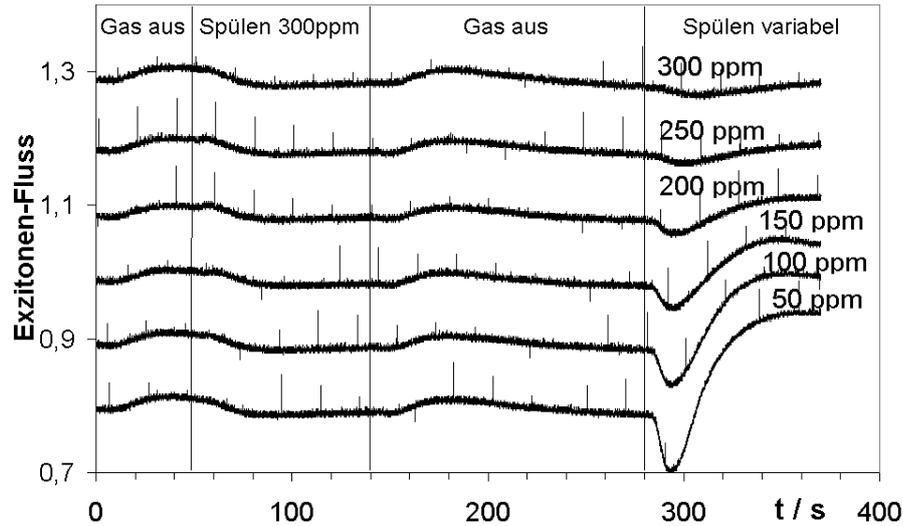
Giersch-Blätter, die sich noch an der Pflanze befanden, wurden in die Anlage eingebaut und 10 min mit der vorgesehenen Lichtintensität ( $100$  oder  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) adaptiert. 50 s nach Beginn der Messung wurde der Gasstrom (300ppm CO<sub>2</sub>, 2%O<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>, Gesamtfluss 210ml/min) eingeschaltet (also zum Blatt gelenkt) und nach weiteren 90 s wieder aus. Diese erste Phase war bei allen Messungen gleich und diente zur Herstellung gleicher Anfangsbedingungen. 280 s nach Messbeginn wurde dann das Gas wieder eingeschaltet, wobei die CO<sub>2</sub>-Konzentration zwischen 300 und 50ppm variiert wurde (O<sub>2</sub>- und N<sub>2</sub>-Fluss blieben konstant), und bei 370 s wieder aus.

Nach jeder dieser Messungen erfolgte erneut eine Adaptionsphase und eine weitere Messung mit einer anderen Konzentration, so dass an einem Blatt je 6 Messungen durchgeführt wurden.

### 13.2 Störung der Schichtung über dem Blatt

Die zugrundeliegende Überlegung war: Ist die anblasende CO<sub>2</sub>-Konzentration höher als in dem vorher ruhenden Profil an den Stomata, müsste der photosynthetische Fluss stimuliert werden, ist er niedriger, müsste man eine Abnahme finden. Man sieht in Abb. 13.1 bei 250 ppm im langsamen Bereich noch eine leichte Erniedrigung des Flusses, die sich bei niedrigeren CO<sub>2</sub>-Konzentrationen in eine Erhöhung umwandeln.

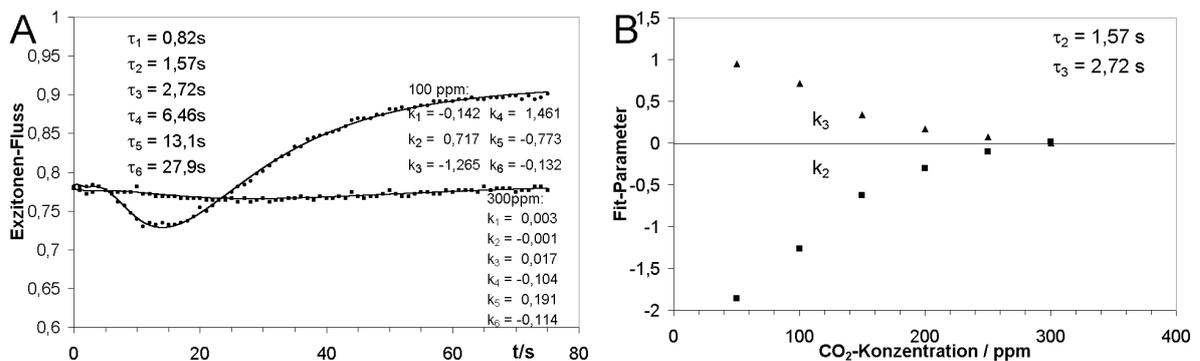
Die durch den Gasstrom induzierten Antworten wurden mit einer Summe von Exponentialfunktionen gefittet, um die einzelnen Komponenten zu trennen. Dieser Fitansatz ist nicht ganz



**Abbildung 13.1:** Effekt von Gasspülungen. Vor der Messung wird mit 300 ppm  $\text{CO}_2$  gespült (50-140 s). Dann bleibt das Gas stehen. Man sieht den Aufbau des Gradienten in der ruhenden Luft an der Steigerung des FC-Flusses (nach den Ergebnissen der Abb. 10.4 eine Steigerung der thermischen Deaktivierung). Dann (ab 280 s) folgt das Spülen mit der am Rande angegebenen  $\text{CO}_2$ -Konzentration. Licht:  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

korrekt, da das Signal nicht linear ist (Hansen et al., 1991), doch er mag als erste Näherung mangels anderer Alternativen der Auswertung gelten.

$$f(t) = \sum_{i=1}^6 k_i \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) \quad (13.1)$$



**Abbildung 13.2:** Fit der Gassprung-Antworten mit Giersch bei  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Licht: (A) Beispiele für zwei Fits: Die Punkte kennzeichnen Messpunkte, die durchgezogenen Linien die zugehörigen Fit-Kurven nach Gleichung 13.1 mit den angegebenen Parametern für Gassprünge auf 300 bzw. 100ppm. Die Zeitachse zählt ab dem Punkt, wo das variable Gas eingeschaltet wurde (280 s in Abb. 13.1). (B) Abhängigkeit der Konstanten  $k_2$  und  $k_3$  (aus Gleichung 13.1) von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration des spülenden Gases. Die Schnittpunkte mit der x-Achse (hier bei ca. 280 ppm) sind in Abb. 13.3 dargestellt.

Da die Sprungmessungen hintereinander am selben Blatt erfolgten, konnte der Fit dieser Daten im „Joint“-Modus durchgeführt werden. Das heißt, dass bei allen Fits einer solchen Serie das Programm immer denselben Satz von Zeitkonstanten für alle sechs Messungen verwenden musste, da diese bei konstanter Lichtintensität gemessen wurden (Vanselow et al., 1988; Hansen et al., 1993).

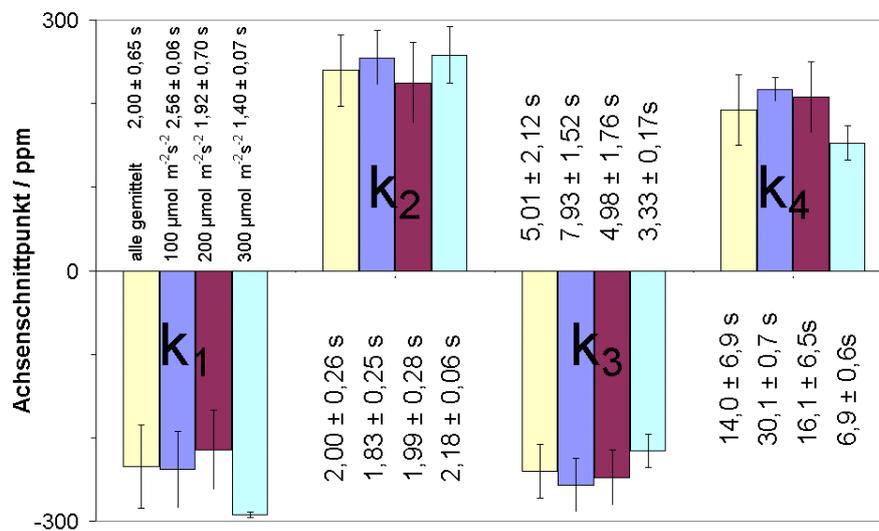
Die Abbildung 13.2A zeigt zwei Beispielmessungen (Sprung auf 3000 bzw. 100 ppm) als Punkte und die dazugehörigen Fitkurven sowie die verwendeten Fitparameter. Für die Sprünge auf 100 ppm wurden die Fit-Parameter nach Lichtintensität sortiert gemittelt und in der Tabelle 13.1 dargestellt.

**Tabelle 13.1:** Gemittelte Fitparameter für die Anpassung der Gleichung 13.1 an die gemessenen Kurven bei einer  $\text{CO}_2$ -Konzentration von 100 ppm und verschiedenen Lichtintensitäten.

	$100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$		$100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
$k_1$	$-124,5 \pm 89,5$	$-835,2 \pm 465,4$	$\tau_1$	$0,68 \pm 0,17$	$0,82 \pm 0,09$
$k_2$	$784,9 \pm 271,5$	$2058,2 \pm 1093,2$	$\tau_2$	$1,60 \pm 0,13$	$1,37 \pm 0,13$
$k_3$	$-1413,8 \pm 394,4$	$-3592,6 \pm 1418,3$	$\tau_3$	$2,69 \pm 0,42$	$2,26 \pm 0,11$
$k_4$	$1344,3 \pm 204,8$	$2840,3 \pm 1576,0$	$\tau_4$	$6,04 \pm 1,09$	$3,71 \pm 0,34$
$k_5$	$-702,3 \pm 200,4$	$-647,9 \pm 750,1$	$\tau_5$	$16,06 \pm 2,92$	$9,44 \pm 2,67$
$k_6$	$-17,6 \pm 190,3$	$-268,1 \pm 81,7$	$\tau_6$	$58,65 \pm 23,34$	$24,18 \pm 2,00$

### 13.3 Bestimmung der Umkehrkonzentration

Die Konstanten  $k_2$  und  $k_3$  einer Serie finden sich in der Abbildung 13.2B. Als Umkehrkonzentrationen wird die Konzentration bezeichnet, bei der die  $k_i$  die x-Achse schneiden. Diese Umkehrkonzentrationen sind für die einzelnen Komponenten aus der Gleichung 13.1 in Abb. 13.3 aufgetragen.



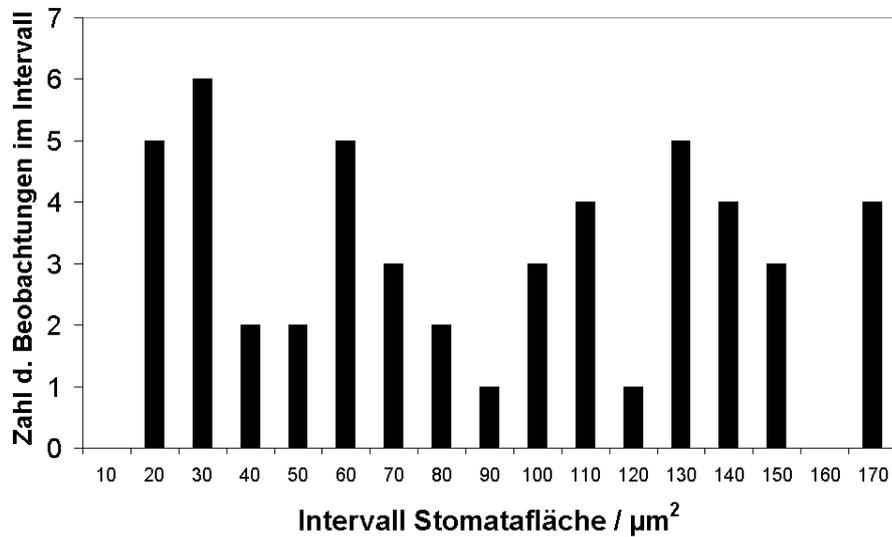
**Abbildung 13.3:** Umkehrkonzentrationen für die ersten 4 Komponenten der Gleichung 13.1. Die ersten drei Komponenten gehören zum photochemischen Fluss. Die vierte Komponente gehört zur Energetisierung der Thylakoidmembran (Negative Konzentrationen zeigen an, dass der zugehörige Koeffizient unter Normalbedingungen negativ ist). Die angegebenen Zahlen sind die Mittelwerte der zugehörigen Zeitkonstanten ( $\tau_i$  in Gleich. 13.1).

Es fällt auf, dass die Umkehrkonzentrationen wie erwartet für die ersten drei Komponenten (die zum photochemischen Fluss gehören) gleich sind. Für die Komponente 4 gilt dies nicht. Sie ist dem Aufbau des pH-Gradienten zugeordnet und hat sowohl einen photochemischen (Ziehen des Calvin-Zyklus an der ETC) und einen nicht-photochemischen Anteil (Energy-Quenching proportional dem luminalen pH an der Thylakoidmembran). Eigentlich müssten alle Komponenten

ten den gleichen Umkehrpunkt haben, denn ungeachtet aller verborgenen Komplexität müsste folgendes gelten: Bläst man an mit der Konzentration, die an der Stomata-Öffnung vor dem Anblasen vorherrscht, sollte es keinen Effekt geben, weil sich nichts ändert (Kein Eingangssignal - kein Effekt).

### 13.4 Verschiedene Umkehrkonzentrationen beim photochemischen und thermischen Fluss

Die Lösung für diese Problematik kann in einer Verteilung offener und geschlossener Stomata liegen, die verschiedene Umkehrkonzentrationen ( $U_1$  und  $U_2$ ) haben. Um diese Hypothese zu untermauern, wurden wie im Kapitel 12 beschrieben die Offenflächen der Spaltöffnungen mit Hilfe eines Mikroskops bestimmt. Diese Flächen wurden auf Bereiche der Größe von  $10 \mu\text{m}^2$  verteilt, ihre Häufigkeit ist in der Abb. 13.4 dargestellt.



**Abbildung 13.4:** Verteilung der Offenflächen von Stomata (Spaltöffnungen): Wie im Kapitel 12 beschrieben, wurden auf Blattstücken von gesundem Weizen die Flächen der Spaltöffnungen ausgemessen. Die Grafik zeigt die Verteilung der Einzelmessungen über Flächenbereiche von  $10 \mu\text{m}^2$ .

Deutlich erkennbar ist eine große Variabilität der Öffnungen. Diese große Schwankung im Öffnungsgrad ist aus der Literatur bekannt: Stomata verhalten sich nicht homogen, sondern individuell (Kaiser und Kappen, 2001). Zwar wurden die Messungen an Weizen gemacht, aber diese grundsätzlichen Aussagen sollten auch bei Giersch zutreffen. Abb. 13.4 unterstützt damit die Hypothese, dass das Vorliegen verschiedener Öffnungsgrade Ursache der unterschiedlichen Umkehrpunkte für die thermische und die photochemische Komponente in Abb. 13.3 sein kann.

Wie die Mischung von Stomata mit verschiedenen Öffnungsgraden die Umkehrpunkte beeinflussen kann, sei im Folgenden durch Gleichungen illustriert. Das Datenmaterial erlaubt allerdings noch keine Auswertung aufgrund dieser Gleichungen.

Die gemessene Umkehrkonzentration ( $U_m$ ) ergibt sich dort, wo die gemessene gaswechselinduzierte FC-Änderung  $F(U_m)$  verschwindet. Diese Bedingung sei getrennt hingeschrieben für die photochemischen Komponenten (Index  $p$ ):

$$F_p(U_{m,p}) = a_1 F_p(U_m - U_1) + a_2 F_p(U_m - U_2) = 0 \quad (13.2)$$

und für die nicht-photochemische Komponente (Index 4):

$$F_4(U_{m,4}) = a_1 F_4(U_m - U_1) + a_2 F_4(U_m - U_2) = 0 \quad (13.3)$$

Hierbei ist  $U_m$  : gemessene Umkehrkonzentration,  
 $U_1$  : aktuelle Konzentration über den Stomata mit Öffnungsgrad 1,  
 $U_2$  : aktuelle Konzentration über den Stomata mit Öffnungsgrad 2,  
 $a_1$  und  $a_2$  die entsprechenden Flächen.

Die Abhängigkeit des Flusses  $F$  von der Abweichung der Gaskonzentration von der Umkehrkonzentration ist nicht genau bekannt. Man sieht aber an der Gleichung, dass es zu keinem unterschiedlichen Umkehrpunkt kommt, wenn eine lineare Abhängigkeit angenommen wird. Ein Skalierungsfaktor für  $F_4$  oder  $F_p$  kürzt sich heraus.

An jeder einzelnen Spaltöffnung kehren sich thermischer und photochemischer Fluss bei gleicher  $\text{CO}_2$ -Konzentration um. Aber je nach Öffnungsgrad liegen diese Umkehrpunkte verschieden, da die Konzentrationen verschieden sind. Am gemessenen Umkehrpunkt werden deshalb die zu den einzelnen Spaltöffnungen gehörenden Systeme nicht am Umkehrpunkt betrieben. Dann sind deren Flüsse aber ungleich null, und der Einfluss unterschiedlicher  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen kann sich unterschiedlich auf thermischen und photochemischen Fluss auswirken. Diese Unterschiedlichkeit liegt an den mit der  $\text{CO}_2$ -Versorgung wechselnden Anteilen von ATP verbrauchenden und ATP-aufbauenden Akzeptoren für PS I. Hierauf wird im Kapitel 10 eingegangen.

### 13.5 Abschätzung des Windeinflusses auf dem Feld

Für die Messung der Windabhängigkeit wurde das Messprotokoll aus Abschnitt 13.1 dahingehend abgewandelt, dass das zweite Spülen immer mit 300ppm  $\text{CO}_2$  erfolgte, aber dafür der  $\text{N}_2$ -Strom und damit die Geschwindigkeit verändert wurden. Die Lichtintensität betrug  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Die Tabelle 13.2 zeigt die Fitparameter mit einfachem Exponential-Ansatz (Gleichung 13.1) aus dem Fit des Stückes mit dem 2. Spülen in Abhängigkeit von der Windgeschwindigkeit. Die Existenz der zwei verschiedenen Gruppen erklärt sich dadurch, dass für die verschiedenen Geschwindigkeitsbereiche zwei unterschiedliche Gasflussregler zum Einsatz kamen.

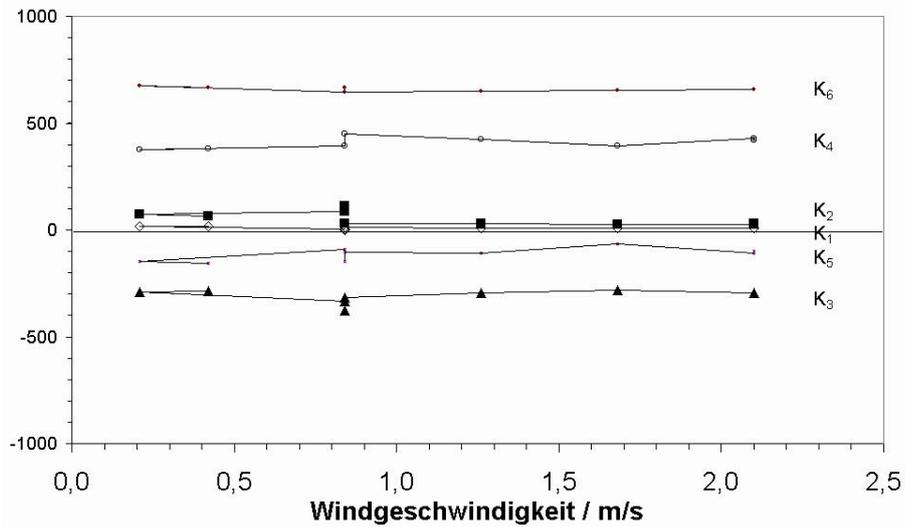
**Tabelle 13.2:** Fitparameter mit Ansatz aus Gleichung 13.1 aus der Reaktion auf das 2. Spülen in Abhängigkeit von der Windgeschwindigkeit.

Wind / $\text{ms}^{-1}$	0,21	0,42	0,84	0,84	$\tau_i$ /s für alle	
$k_1$	0,017	0,016	0,006	0,002	$\tau_1$	0,437
$k_2$	0,072	0,066	0,087	0,114	$\tau_2$	2,489
$k_3$	-0,289	-0,284	-0,332	-0,375	$\tau_3$	5,229
$k_4$	0,377	0,382	0,395	0,449	$\tau_4$	16,250
$k_5$	-0,149	-0,155	-0,093	-0,148	$\tau_5$	62,132
$k_6$	0,673	0,668	0,645	0,665		

Wind / $\text{ms}^{-1}$	0,84	1,26	1,68	2,1	2,1	$\tau_i$ / s für alle	
$k_1$	0,013	0,010	0,007	0,011	0,007	$\tau_1$	0,412
$k_2$	0,028	0,031	0,024	0,026	0,028	$\tau_2$	2,130
$k_3$	-0,316	-0,295	-0,283	-0,295	-0,293	$\tau_3$	6,151
$k_4$	0,450	0,423	0,394	0,428	0,421	$\tau_4$	16,465
$k_5$	-0,102	-0,106	-0,065	-0,107	-0,098	$\tau_5$	63,735
$k_6$	0,645	0,648	0,652	0,657	0,656		

Abbildung 13.5 zeigt die Parameter  $k_i$  über der Windgeschwindigkeit aufgetragen. Man sieht, dass bei der minimalen Geschwindigkeit von nur  $0,2 \text{ m/s}$  die Wirkung bereits maximal ist und dann nicht mehr zunimmt. Das bedeutet, dass eine Windstärke von nicht einmal 1 Beaufort ( $0,3$  bis  $1,5 \text{ m/s}$ ) ausreicht, die Grenzschicht zu verwirbeln. Man kann in Feldversuchen also davon ausgehen, dass die Gradienten über den Blattöffnungen verwirbelt sind.



**Abbildung 13.5:** Abhängigkeit der Koeffizienten  $k_i$  der Antwort der Fluoreszenz aus Gleichung 13.1 von der Geschwindigkeit der Gasströmung auf den zweiten Gassprung

## Kapitel 14

# Nachweis von reaktivem Sauerstoff (ROS) mit Hilfe von Farbstoffen

Wenn der Pilz versucht, eine Pflanze zu befallen (wie im Abschnitt 4.2 beschrieben), so löst dies vielfältige Reaktionen aus: Zum einen versucht der Pilz, in das Blattgewebe einzudringen, zum anderen ergreift die Pflanze Maßnahmen, um genau dies zu verhindern. Diese können z. B. die Verstärkung der Zellwände durch Callose und der Kutikula oder die Bildung von Papillen sein (Prell, 1996; Smart et al., 1986). Eine andere Abwehrstrategie besteht aus dem Abtöten der die Pilzhyphe umgebenden Zellen mit einer massiven Freisetzung von reaktivem Sauerstoff (sog. „hypersensitive cell death response“, Hückelhoven et al., 1999, 2000). In solchen Pilz-Pflanzen-Interaktionen ist also in den allermeisten Fällen ROS beteiligt (Rolke et al., 2004; Moore et al., 2002; Doke und Miura, 1995; Hückelhoven und Kogel, 2003). Deshalb werden in diesem Kapitel Untersuchungen gezeigt, die sich direkt mit dem Nachweis von ROS in den Blättern beschäftigen.

### 14.1 Farbstoffe für den Nachweis von reaktivem Sauerstoff

#### 14.1.1 Dichlorofluorescein-Diacetate (DCF-DA)

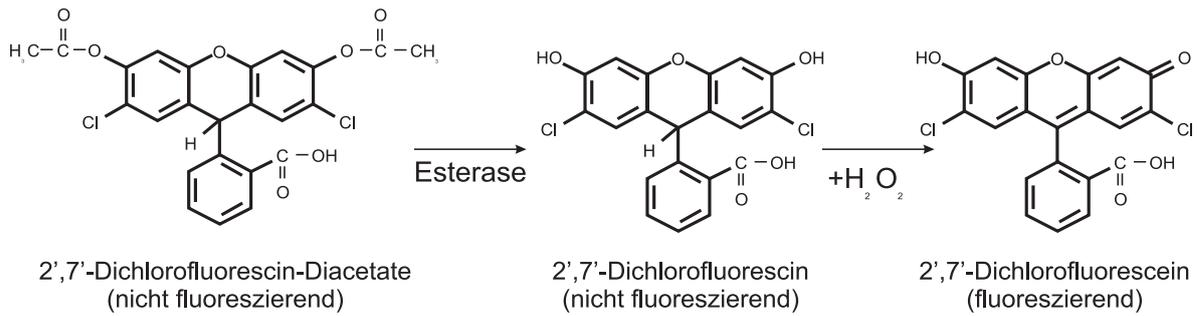
##### Struktur und Eigenschaften von DCF

Dichlorofluorescein-Diacetat (DCF-DA) dient als Indikator für oxidativen Stress in Zellen, indem es Peroxide nachweist, z. B.  $H_2O_2$  (Bass et al., 1983; Brandt und Keston, 1965; Myhre et al., 2003; Trayner et al., 1995; Deng et al., 2002; Maxwell et al., 1999; Tarpey et al., 2004).

Durch das angehängte Diacetat (-DA) wird es unpolar und kann frei durch die Zellwand diffundieren (Rosenkranz et al., 1992). Innerhalb der Zelle entfernen Esterasen die Acetat-Gruppen. Das dabei entstehende polare DCF kann die Zelle nicht mehr verlassen. Trifft es nun auf Peroxide, so wird es in das grün fluoreszierende DCF umgewandelt. Abbildung 14.1 zeigt die hierbei beteiligten Formen des DCF. Man achte dabei jeweils auf die obere rechte Ecke. Die Umwandlung in die fluoreszierende Form geschieht allerdings nur effizient in Anwesenheit von Peroxidasen (Burkitt und Wardman, 2001), die in der Zelle vorhanden sind. Die Anregung des Farbstoffes und die Aufzeichnung der Fluoreszenz der Blätter werden im Abschnitt 14.2 beschrieben.

##### Beladung des Blattes mit DCF

In Wasser gestellte Blätter saugten die Lösung mit dem Transpirationsstrom an. Dazu löst man den Farbstoff (hier DCF-DA) in Ethanol mit einer Ausgangskonzentration von 5mM. Von dieser Lösung wurde so viel zum SM-Medium gegeben, dass sich eine Endkonzentration von  $60\mu\text{M}$  DCF-DA ergab. Das zu beladende Weizenblatt musste unter Wasser abgeschnitten werden, damit keine Luftblasen ins Xylem eindringen und sich keine Embolien bilden konnten.



**Abbildung 14.1:** Reaktionsschema von Dichlorofluorescein-Diacetate (DCF-DA): Das nicht-fluoreszierende DCF-DA (links) kann durch die Zellwand diffundieren. Esterasen in der Zelle entfernen die Acetate-Gruppen. Das dabei entstehende DCF (Mitte) kann die Zelle nicht mehr verlassen. Es wird durch  $H_2O_2$  unter Anwesenheit von Peroxidasen in das fluoreszierende DCF (rechts) umgewandelt (siehe OH-Gruppe oben rechts). Schema nach Bass et al. (1983).

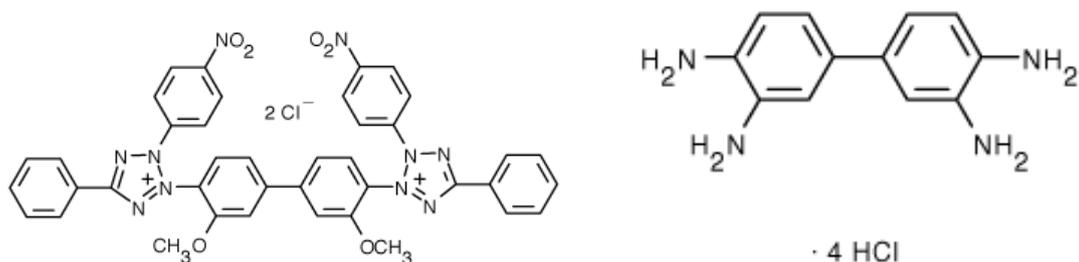
Die Aufnahme des Farbstoffes aus dem SM-Medium durch den Transpirationsstrom dauerte 2–4 Stunden.

#### 14.1.2 Nitroblue-Tetrazolium (NBT) und Diaminobenzidine (DAB)

Die Verwendung von DCF-DA als alleiniger ROS-Indikator ist allerdings nicht empfehlenswert, da die Funktion des DCFs durch die Anwesenheit von reduzierenden und oxidierenden Substanzen in der Zelle zusätzlich zur eigentlichen ROS-Last beeinflusst wird (Batandier et al., 2002; O'Malley et al., 2004; Rota et al., 1999). Aus diesem Grund wurden NBT und DAB als weitere Farbstoffe zur Kontrolle verwendet.

##### Struktur und Eigenschaften von NBT und DAB

Nitroblue-Tetrazolium (NBT) wird von  $O_2^-$  reduziert (Hückelhoven und Kogel, 1998; Hückelhoven et al., 2000) und fällt als blauer Farbstoff aus. 3,3-Diaminobenzidine (DAB) hingegen reagiert mit  $H_2O_2$  zu einem braunen Polymer (Hückelhoven et al., 1999; Hückelhoven und Kogel, 2003). Beides lässt sich in entfärbten Blättern im Lichtmikroskop sehen. Die Strukturen zeigt Abbildung 14.2.



**Abbildung 14.2:** Struktur der Farbstoffe Nitroblue-Tetrazolium (NBT, links) und Diaminobenzidine (DAB, rechts)

##### Beladung des Blattes mit NBT und DAB

Beide Farbstoffe wurden wie DCF-DA über den Transpirationsstrom der abgeschnittenen Blätter aufgenommen. NBT wurde in 1xPBS bei pH 7.8 gelöst und dann mit SM-Medium auf eine

Konzentration von 6 mM verdünnt. DAB wird in 0,1M HCL gelöst und dann ebenfalls mit SM-Medium auf eine Konzentration von 5 mM verdünnt.

Die Beladung des Blattes erfolgte wie schon bei DCF über den Transpirationsstrom über einen Zeitraum von 3 Stunden.

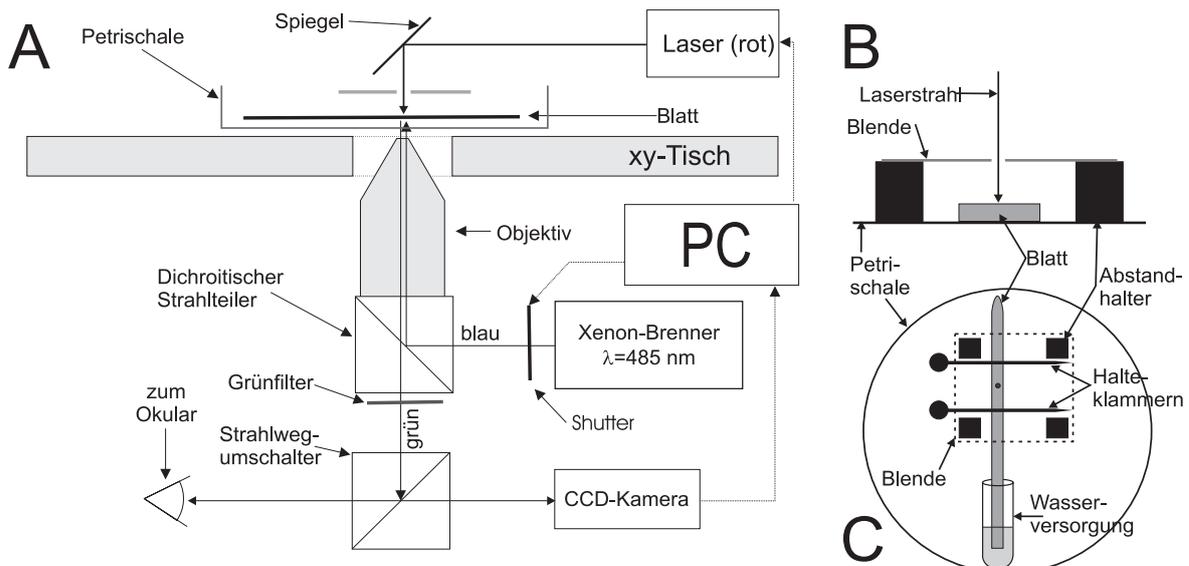
### Entfärbung

Da sowohl NBT als auch DAB nicht fluoreszieren, sondern als Farbstoff ausfallen, ist es nötig, vor der Auswertung das Blatt zu entfärben (sonst würde insbesondere das Chlorophyll die Farbstoffe verdecken). Dies geschieht, indem man das Blatt für ca. 24 h in eine Lösung aus 40 ml Ethanol, 10 ml Chloroform und 75 mg Trichloressigsäure (TCA) legt. Danach ist das Chlorophyll fast komplett verschwunden, und das Blatt kann zur Betrachtung in ein Wasser-Glycerin-Gemisch (1:1) gelegt werden, was das Austrocknen verhindert.

## 14.2 Fluoreszenzmikroskop für DCF-Messungen

Wie im Abschnitt 14.1.1 beschrieben, beruht der Nachweis von  $H_2O_2$  mit dem Farbstoff DCF auf der Messung seiner Fluoreszenz. Hierzu diente der in Abbildung 14.3 gezeigte Messaufbau.

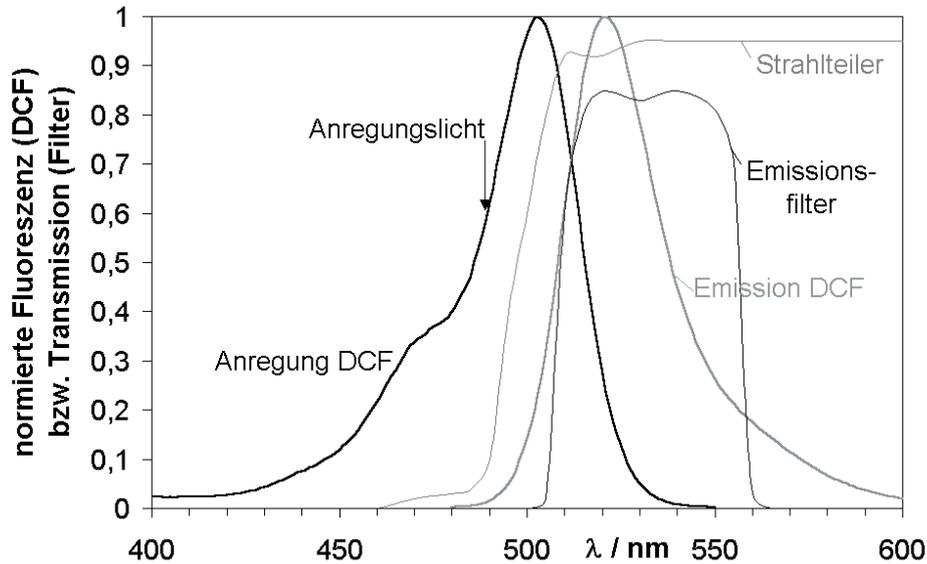
### 14.2.1 Aufbau und Fluoreszenzmessung



**Abbildung 14.3:** Messaufbau zur Erfassung der Fluoreszenz von DCF-DA als  $H_2O_2$ -Nachweis. (A) Das mit DCF-DA beladene Blatt liegt in einer Petrischale von zwei Klammern fixiert auf dem xy-Tisch. Die Xenon-Lampe erzeugt das Messlicht (Anregungslicht für die DCF-Fluoreszenz) bei  $\lambda = 488 \text{ nm}$ . Die Fluoreszenzemission wird durch den dichroitischen Strahlteiler (blaues Licht zum Blatt hin und grünes weg) und einen Strahlumschalter wahlweise zum Okular oder zur CDD-Kamera geleitet. Über einen Spiegel und durch eine Blende aus Alufolie beschränkt, kann ein Laserstrahl (aktin. Licht) auf das Blatt gegeben werden. Der PC steuert den Laser und die Leuchtdauer des Anregungslichtes (über den Shutter) und nimmt das Kamerasignal auf. (B) Das Blatt von vorne gesehen mit der Blende und den Abstandhaltern (nicht maßstabsgetreu). (C) Aufsicht auf die Petrischale und das befestigte Blatt.

Zur Messung wird das mit Farbstoff beladene Blatt in eine Petrischale gelegt und von zwei kleinen Haltern fixiert (siehe Abb. 14.3 C). Das untere Blattende steckt in einem kleinen Gefäß (Eppendorf-Tube, 0,5 ml), welches mit SM-Medium (Standard-Medium: 1 mM KCl, 1mM CaCl,

1mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6,2) gefüllt ist und der Wasserversorgung während der Messung dient. Die mit dem Blatt beladene Petrischale wird über dem Objektiv (falls nichts anderes angegeben: 10x Nikon Fluor 10 Ph2DL) des inversen Mikroskops (Diaphot, Nikon, Düsseldorf) befestigt (siehe Abb. 14.3 A). Mikromanipulatoren ermöglichen eine horizontale 2-dimensionale Bewegung des xy-Tisches; Beschreibung auch in Plieth und Hansen (1996).



**Abbildung 14.4:** Anregungs- und Emissionsspektrum des Fluoreszenz-Farbstoffes DCF und Transmissionsspektren des im Mikroskopaufbau verwendeten Strahlteilers und Emissionsfilters. Der Pfeil markiert die Wellenlänge des Anregungslichtes der Xenon-Lampe.

Abbildung 14.4 zeigt das Anregungs- und Emissionsspektrum von DCF. Bei den gekennzeichneten 488 nm erfolgt die Anregung mit dem Licht einer Xenon-Lampe mit nachgeschaltetem Monochromator (TILL Photonics, Gräfelfing). Dies geschieht so weit entfernt vom Maximum, da sonst eine saubere Trennung vom Emissionslicht nicht gewährleistet wäre. Das Anregungslicht wird über einen dichroitischen Strahlteiler (500dcsr, AHF, Tübingen) durch das Objektiv zum Blatt geleitet. Vom Fluoreszenzlicht trennt dieser Strahlteiler den langwelligeren Anteil ab (Spektrum siehe Abb. 14.4). Ein weiteres Emissionsfilter (HQ535/50, AHF) entfernt dahinter die Anteile mit einer Wellenlänge größer als ca. 560 nm, so dass weitestgehend die DCF-Fluoreszenz-Antwort alleine zur Auswertung auf einen Strahlwegumschalter trifft. Dieser führt das Licht wahlweise zum Mikroskop-Okular oder zu einer CCD-Kamera (TILL) mit einer Auflösung von 640x480 Punkten mit je 12 Bit. Der Steuerrechner synchronisiert den Shutter mit der Bildaufnahme der Kamera. Bei allen folgenden Messungen betrug die Leuchtzeit der Lampe 5 ms, falls nichts anderes angegeben wurde. Alle 12 s wurde eine Aufnahme gemacht.

### 14.2.2 Messsteuerung und Bildauswertung

Die Steuerung des Messablaufes (Anregungslicht, Lichtsteuerung), die Aufnahme und Speicherung der Bilder und die Auswertung erfolgte mit der Software TillVision (Version 3.31, TILL).

Für die Auswertung ermöglicht es die Software, interessante Bereiche in den Bildern (ROI: „Region of Interest“) zu markieren und dann den Intensitätsmittelwert über diese Flächen zu berechnen. Je nach Messprotokoll dient bereits dieser Mittelwert als Messergebnis oder seine zeitliche Abfolge.

### 14.2.3 Aktinisches Licht

Das aktinische Licht erzeugt der in der Abbildung 14.3A eingezeichnete Laser (Wellenlänge 632 nm). Es kamen zwei verschiedene Konfigurationen zum Einsatz, um das Laserlicht auf das Blatt zu lenken: mit Umlenkspiegel oder mit Lichtleitfaser (siehe unten).

#### Bestimmung der Blattabsorption

Bei dem verwendeten Aufbau wurde die Fluoreszenz von unten gemessen, stammte also nur von den unteren Zellschichten. Das Laserlicht hingegen wurde von oben eingestrahlt, es musste also erst das Blatt durchqueren, bevor es dort wirken konnte, wo die Fluoreszenz gemessen wurde. Zur Einschätzung, wieviel Licht dort noch ankommt, wurde die Blattabsorption bestimmt.

Die Lichtintensität des Lasers wurde mit und ohne Blatt aufgenommen. Hierfür musste der Laserstrahl mit Graufiltern (bei Umlenkspiegel: 0,12% Transmission, bei Lichtfaser: 1,2%) stark abgeschwächt werden, um die Kamera nicht zu übersteuern. Der Strahlteiler (welcher das rote Laserlicht sonst herausfiltert) wurde dazu herausgenommen. Aus dem Quotienten der gemessenen Intensitäten ergab sich eine Transmissionsrate zwischen 3 und 4% für den nach Abschnitt 4.1.2 angezogenen jungen Weizen.

#### Laser mit Umlenkspiegel

Wie in der Abbildung 14.3A eingezeichnet, wurde der Laser durch einen Spiegel von oben auf das Blatt gelenkt. Da bei dem verwendeten 10-fach-Objektiv der beleuchtete Bereich den ganzen „Sichtbereich“ der Kamera abdecken würde, wurde oberhalb des Blattes eine Blende aus Alufolie mit einem kleinen Loch ( $\varnothing$  ca. 0,7 mm) gelegt. Um den Gasaustausch nicht zu behindern, wurden Abstandshalter verwendet (siehe Abb. 14.3B).

Die Intensität des Lasers auf Höhe der Petrischale wurde mit einem Licor-Gerät (Li-250, Licor, Lincoln, Nebraska, USA) bestimmt zu  $22.300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Dies ergab sich aus folgenden Daten: Geräteanzeige:  $171 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Fläche Lichtsensor:  $50 \text{ mm}^2$ , Fläche des Loches in der Folie und damit des Laserflecks auf dem Sensor:  $0,38 \text{ mm}^2$ ; dies resultierte in einem Korrekturfaktor für die Geräteanzeige von 130.). Daraus ergab sich mit der gemessenen Blattabsorption eine Laserintensität auf der Blattunterseite von 670 bis  $890 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

#### Laser mit Lichtleitfaser

Der Leuchtfleck des Lasers war trotz der Blende relativ groß. Um den Bereich zu verkleinern, wurde in einer anderen Variante das aktinische Licht mit einer Lichtleitfaser (Durchmesser  $250 \mu\text{m}$ ) geführt, die vorsichtig mit einem Mikromanipulator auf das Blatt aufgesetzt wurde.

Hier ergab sich die Lichtintensität am Ende der Leitfaser zu ca.  $5000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Geräteanzeige:  $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , Fläche Lichtsensor:  $50 \text{ mm}^2$ , Fläche des Laserfleck auf dem Sensor:  $0,05 \text{ mm}^2$ , ergab einen Korrekturfaktor für die Geräteanzeige von 1004). Mit der gemessenen Blattabsorption blieben dann auf der Unterseite noch 150 bis  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  übrig.

#### Helligkeit des Messlichtes

Das blaue Fluoreszenz-Anregungslicht wurde auf die gleiche Weise mit dem Lichtmessgerät bestimmt, nur dass dieses Licht von unten durch das Objektiv geleitet wird (siehe Abb. 14.3A) und damit von der Vergrößerung abhängig ist.

Da das Messlicht nur eine kurze Zeit eingeschaltet war und sich die aktinische Wirkung aus dem Mittelwert über die Zeit ergab, musste die gemessene Intensität durch das Tastverhältnis  $T$  geteilt werden:

$$T = \frac{t_{\text{aus}}}{t_{\text{an}}} = \frac{12\text{s}}{5\text{ms}} = 2400 \quad (14.1)$$

In der Tabelle 14.1 finden sich die bei den verschiedenen Objektiven gemessenen Lichtintensitäten und die daraus ermittelten aktinisch wirksamen Lichtstärken. Zumindest bei den verwendeten 4-fach und 10-fach Objektiven ist das Messlicht so schwach, dass es keine aktinische Wirkung haben dürfte.

**Tabelle 14.1:** Intensitäten des 488nm-Anregungslichtes für die DCF-Fluoreszenz: Der gemessene Durchmesser des Lichtflecks ergibt zusammen mit den Maßen des Sensors des Lichtmessgerätes ( $\varnothing 8$  mm) den Umrechnungsfaktor von der gemessenen auf die tatsächliche Intensität.

Objektiv	$\varnothing$ Lichtfleck	Faktor	Intensität gemessen	tatsächliche Intensität	aktinische Intensität
4x	2 mm	15,21	$41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$623 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$0,3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
10x	1,2 mm	42,25	$45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$1901 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$0,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
20x	0,5 mm	243	$40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$9734 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	$4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

## 14.3 Morphologische Untersuchungen zur ROS-Entwicklung bei Pilzbefall

Die folgenden Bilder sollen einen Eindruck vermitteln, wie ein Pilz sich auf einem Blatt ausbreitet und an welchen Stellen die ROS-Entwicklung stattfindet.

### 14.3.1 Bildaufnahme

Die Aufnahmen in Abb. 14.5A-C und 14.6 entstanden mit der in Abschnitt 14.1.1 beschriebenen DCF-Technik: Die Blätter (angezogen wie in Abschnitt 4.1.2 (S.25) beschrieben) wurden mit *Septoria tritici* infiziert und mit dem Farbstoff DCF-DA beladen. Dieser wurde bei Raumlicht über mehrere Stunden aufgenommen. Dann wurden die Bilder mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen (Anregung mit Argon-Laser bei 488 nm, Detektion bei 505–540 nm; verwendete Geräte: Abb. 14.5A,B: Zeiss LSM510 mit Objektiv Achronplan 10x 0,30WPh1; Abb. 14.5C und 14.6: Leica TCS SP mit Objektiv HC PL Apo 20x/0,70). Die Graubilder des Detektors wurden grünlich eingefärbt.

Das Bild 14.5C ist eine orthogonale Projektion aus einem Stapel von 32 Bildern mit einem Abstand (in z-Richtung) von  $5 \mu\text{m}$ .

Die Abbildungen 14.5D und 14.7 zeigen die Aufnahme von zwei Blattstellen eines infizierten und mit DAB beladenen Weizenblattes nach dessen Entfärbung. Die Bilder wurden mit einem Macromikroskop (ILD Heerbrugg Makroskop M 420), Vergrößerung 32x, und einer Sony 3CCD-Kamera aufgenommen und mit der Software Imagic Image Access 3.10 verarbeitet.

### 14.3.2 Pilzhyphen

In Abb. 14.5A rührt die DCF-Fluoreszenz von zwei Strukturen her: von den parallelen Leitbündeln des Blattes und von dem sich netzartig über das Blatt ausbreitenden Pilz. Ein sehr ähnliches Bild ergibt sich bei der Benutzung des Farbstoffes DAB: Auch in Abb. 14.5D sind die Leitbündel und die Hyphen gut zu erkennen. Die ROS-Produktion in den Leitbündeln ist keine Folge der Pilzinfektion, sondern ein integraler Bestandteil des pflanzlichen Wachstumsprozesses. Die Ligninbildung in den Wänden benötigt die Anwesenheit von ROS (Belinky et al., 2003; Ros-Barceló et al., 2002; Pomar et al., 2002; Thordal-Christensen et al., 1997; Ros-Barceló, 1995). Für das Projekt dieser Arbeit ist die ROS-Bildung entlang der Hyphen von Bedeutung. Hierbei ist noch nicht einmal sicher, ob der Pilz ROS benötigt, um die Zellwände zu zerstören, oder die

Pflanze mit dem ROS die Pilzhyphen angreift (Rolke et al., 2004; Moore et al., 2002; Doke und Miura, 1995; Hückelhoven et al., 1999, 2000; Hückelhoven und Kogel, 2003).

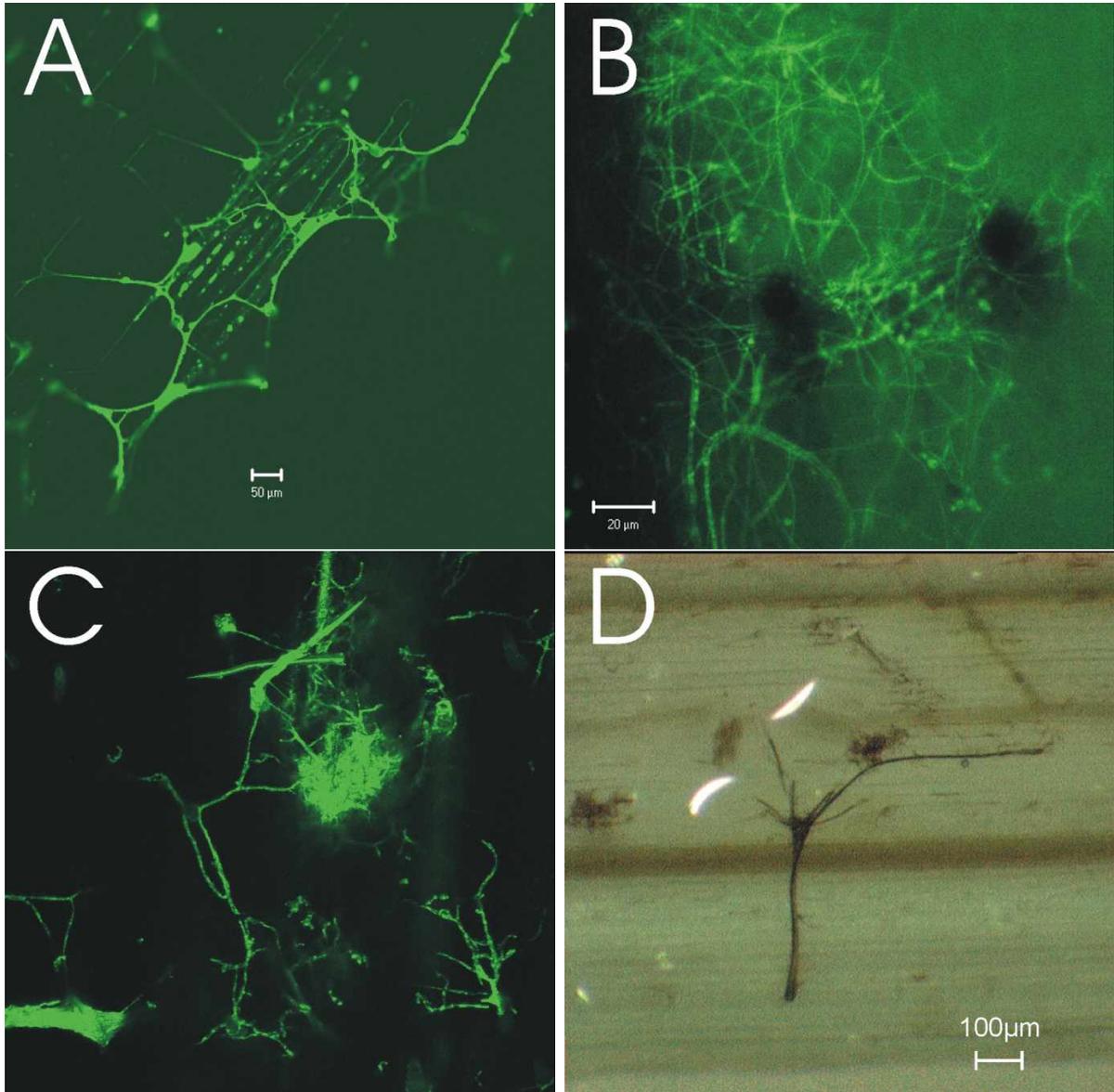
Aber auch die ROS-Bildung um die Hyphen steht nicht im Zentrum des Interesses dieser Arbeit. Es geht um die Wirkung des Pilzes auf den Stoffwechsel in Chloroplasten und Mitochondrien und weniger um die bereits intensiver untersuchte ROS-Bildung im Apoplasten (Hückelhoven et al., 2000; Schopfer et al., 2001). Abb. 14.7 zeigt einen Bereich mit ROS-Entwicklung, der nicht mehr eindeutig den Hyphen zuzuordnen ist. Hier scheint das ganze Gewebe zu antworten. Ebenso ist in den Abbildungen Abb. 14.5B, C ein weitverzweigtes Netz von Pilzhyphen erkennbar. Die Bereiche dazwischen leuchten aber ebenfalls schwach und zeigen so ROS-Entwicklung im Gewebe an.

In Hinblick auf die Frage der ROS-Bildung außerhalb der Hyphenkontakt-Linien ist Abb. 14.6 wichtig. Hier ist die rote Chlorophyll-Fluoreszenz mit der grünen DCF-Fluoreszenz überlagert worden. Koinzidenz der Entstehungsorte sollte zu gelbem Licht führen. Man sieht tatsächlich eine weitgehende Koinzidenz von Chlorophyll-Fluoreszenz und DCF-Fluoreszenz. Einige größere grüne Flecken sind zu erkennen, was entweder auf massive ROS-Freisetzungen in Form einer hypersensitiven Reaktion hindeutet (Hückelhoven et al., 1999; Thordal-Christensen et al., 1997; Wei et al., 1994) oder aber auf dichteres Hyphengeflecht des Pilzes.

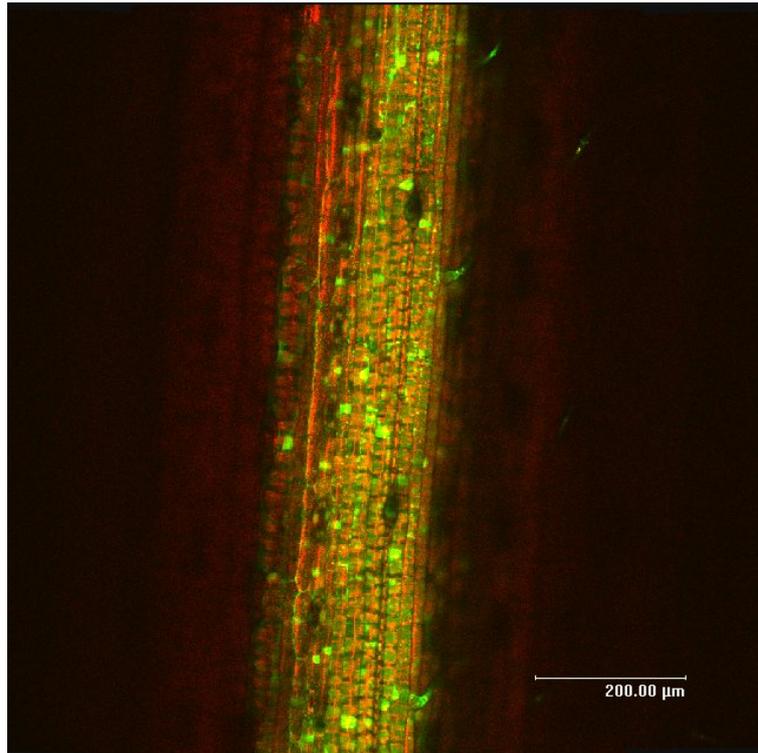
Die überwiegend gelb-rötliche Farbe könnte ein Hinweis sein, dass das pilzinduzierte ROS in den Chloroplasten entsteht. Doch die räumliche Auflösung ist zu gering um auszuschließen, dass auch Mitochondrien oder Peroxisomen auf der Oberfläche der Chloroplasten dieses ROS produzieren.

### 14.3.3 Unterschiede der Farbstoffe

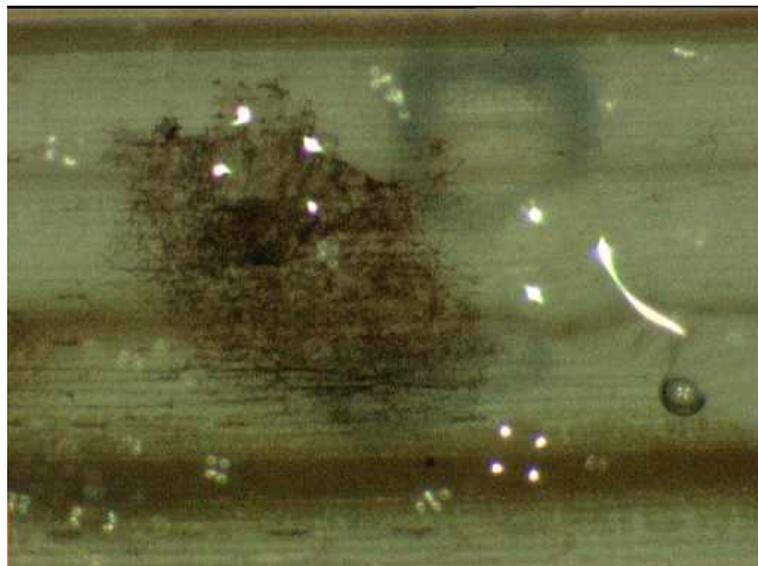
Im Abschnitt 14.1 war gesagt worden, dass andere Farbstoffe als DCF zur Kontrolle eingesetzt werden, da reduzierende und oxidierende Substanzen in der Zelle zusätzlich zur eigentlichen ROS-Last das DCF und damit die gemessene Fluoreszenz beeinflussen. Ein Vergleich der mit DCF aufgenommenen Bilder in Abb. 14.5A-C mit den Aufnahmen mit DAB in Abb. 14.5D und 14.7 zeigt aber deutlich, dass die Färbung ähnliche Bereiche betrifft und sich nicht signifikant in der Qualität unterscheidet, so dass beide Farbstoffe eingesetzt werden können.



**Abbildung 14.5:** Bilder von Weizenblättern, die zuvor mit *Septoria tritici* infiziert wurden. (A-C) DCF-Fluoreszenz von mit DCF-DA beladenen Blättern aufgenommen mit einem konfokalen Mikroskop. Das Fluoreszenz-Signal ist grün eingefärbt. Hauptsächlich erkennbar sind die gefärbten Pilzhyphe, eine diffuse ROS-Verteilung im Umfeld und in A die Leitbündel. (D) ROS-Nachweis mit DAB, das bei Kontakt mit  $H_2O_2$  als braunes Polymer ausfällt. Danach wurde das Chlorophyll entfernt, das Blatt fixiert und unter dem Mikroskop photographiert. Deutlich erkennbar sind die Blattadern (horizontal), bei denen die ROS-Erzeugung mit der Lignin-Bildung zusammenhängt, zusätzlich deutlich eine Pilzhyphe.



**Abbildung 14.6:** DCF-Fluoreszenz eines mit DCF-DA beladenen Weizenblattes, das zuvor mit *Septoria tritici* infiziert wurde, aufgenommen mit einem konfokalen Mikroskop. Das Bild zeigt eine Überlagerung der grün gefärbten DCF-Fluoreszenz, aufgenommen bei 520 nm, und der rot eingefärbten Chlorophyll-Fluoreszenz, aufgenommen bei 680 nm. ROS-Entwicklung in den Chloroplasten erscheint damit als gelb

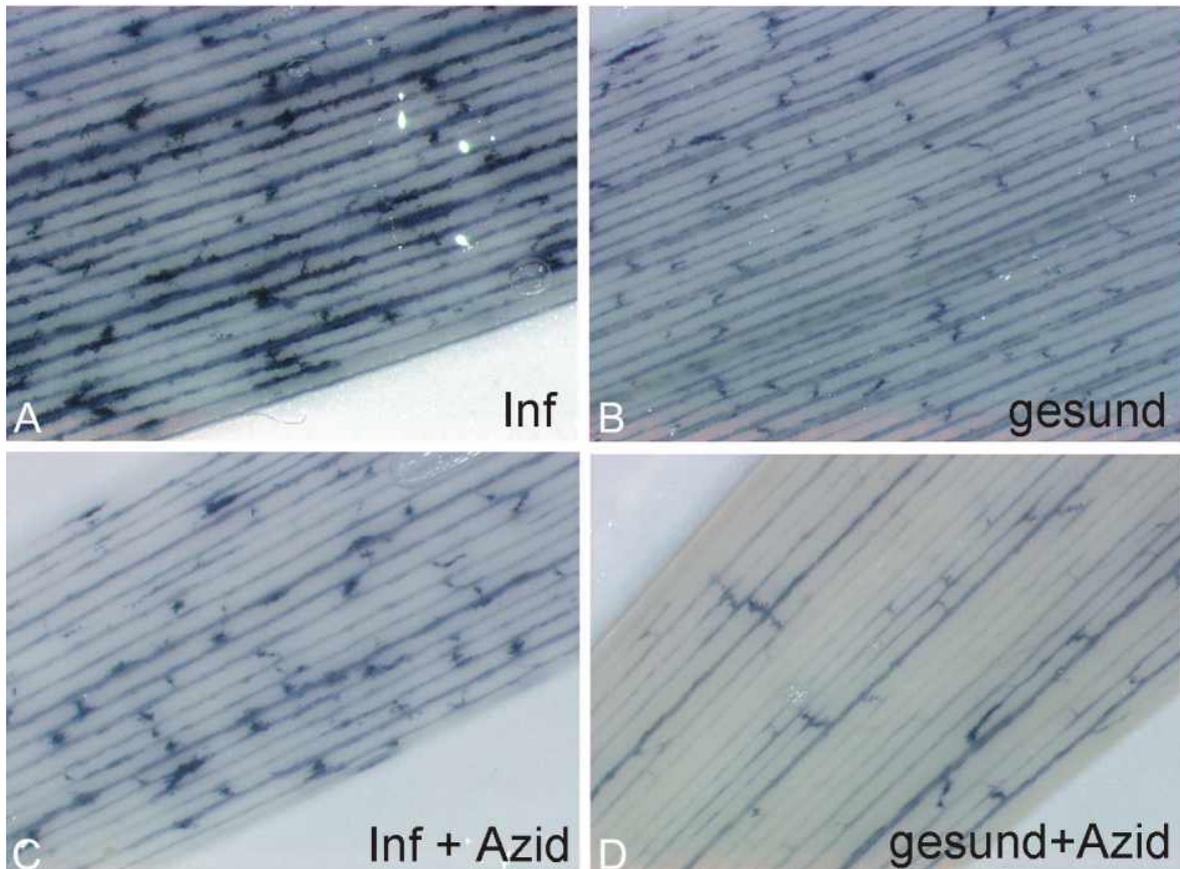


**Abbildung 14.7:** ROS-Nachweis mit DAB: Ein mit *Septoria tritici* infiziertes Weizenblatt wurde mit dem Farbstoff DAB beladen, der bei Kontakt mit  $H_2O_2$  als braunes Polymer ausfällt. Danach wurde das Blatt fixiert und unter dem Mikroskop photographiert. Deutlich erkennbar sind die Blattadern (horizontal), bei denen die ROS-Erzeugung mit der Lignin-Bildung zusammenhängt, deutlich auch ein Bereich verstärkter ROS-Bildung im Gewebe aufgrund der Infektion.

## 14.4 ROS-Bilder mit NBT

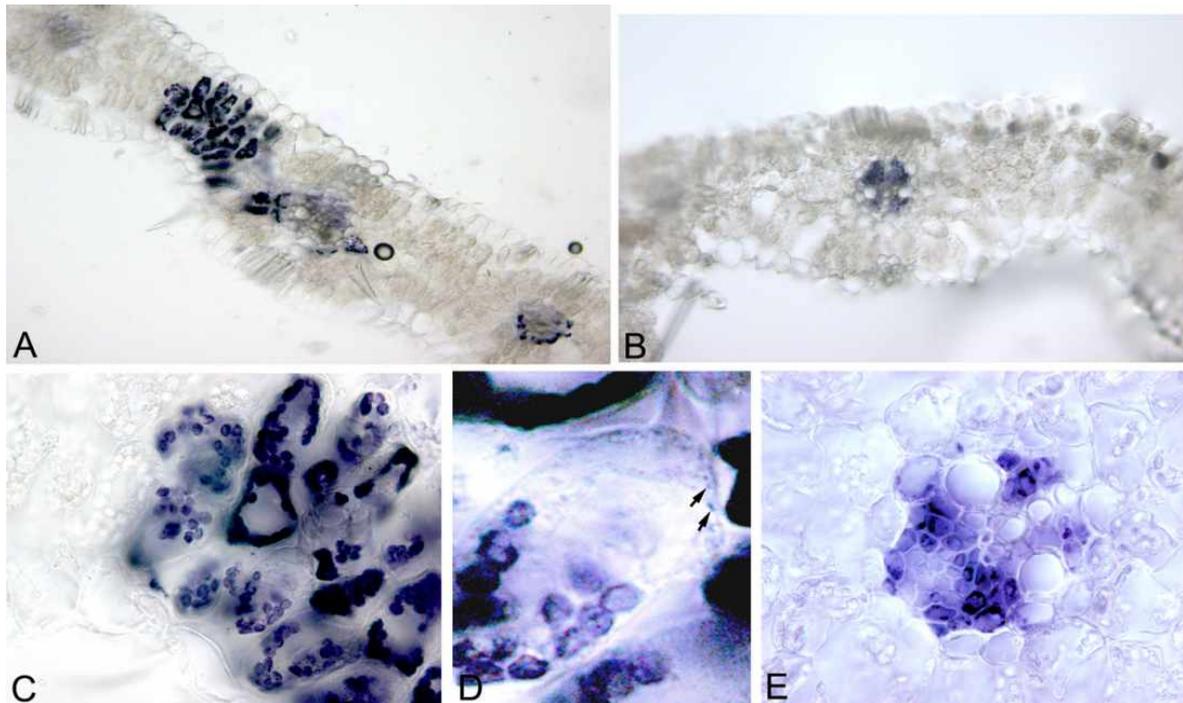
Für besser aufgelöste Bilder wurden für diesen Abschnitt Messungen mit Blattsnitten angefertigt. Weizenblätter wurden mit *Septoria nodorum* infiziert. 48 h später wurde der Farbstoff NBT (nitroblue tetrazolium) geladen (uptake 3h; 21°C; bei Licht), indem die abgeschnittenen Weizenblätter ihn mit dem Transpirationsstrom ansaugten. Die Fixierung und Entfärbung erfolgte wie im Abschnitt 14.1.2 beschrieben. Zusätzlich wurde bei einigen Blättern Azid geladen, welches den gesamten Energie-Stoffwechsel ausschaltet.

Die mikroskopische Analyse erfolgte im Hellfeld. Gefrierschnitte wurden als fixiertes Material nach Einbettung in 20% Sucrose/PBS hergestellt und mikroskopisch analysiert.



**Abbildung 14.8:** Mikroskopischer Nachweis von ROS im Blattgewebe von Weizen durch den Indikatorfarbstoff Nitrotetrazolium Blau (NBT), der nach Reaktion mit  $O_2^-$  als blaues unlösliches Polymer im Gewebe ausfällt. (A) Mit *Septoria nodorum* infiziertes Blatt ohne Azid-Behandlung. (B) Kontrollblatt ohne Azid-Behandlung (C) Infiziertes Blatt mit Azid-Behandlung (schließt alle Membranen kurz und legt damit den gesamten Energiestoffwechsel lahm. (D) Kontrollblatt mit Azid-Behandlung. Messungen von Frau Dr. Christine Desel (AG Krupinska, Botanik, Kiel).

Abb. 14.8 zeigt, dass ROS an den Leitungsbahnen auftritt. Dies enthält keine hier wichtige Aussage, da diese ROS-Bildung mit der ständig laufenden Lignin-Bildung zusammenhängt. Aber die infizierten Pflanzen zeigen eine stärkere Bildung und dies insbesondere auch außerhalb der Leitungsbahnen. Die stärkere Wirkung in Abwesenheit von Azid (Abb. 14.8A) bedeutet, dass der Stoffwechsel wichtig für die ROS-Bildung ist. Das Auftreten von ROS in Zellen wird sehr viel deutlicher in den Schnitten der Abb. 14.9. Im infizierten Blatt (Abb. 14.9A) tritt ROS in Mesophyllzellen außerhalb des Leitungsgewebes auf. Die Ausschnittsvergrößerung (Abb. 14.9 C und D) von Abb. 14.9A bestätigt, dass in den Mesophyllzellen und nicht in den Epidermiszellen ROS vermehrt gebildet wurde. Insbesondere bei der höheren Vergrößerung (Abb. 14.9D)



**Abbildung 14.9:** Detektion von ROS im Blattgewebe (Blattquerschnitt; ohne Azid-Behandlung) von Weizen. (A, C, D) Blatt infiziert mit *Septoria nodorum*, (B, E) Gesundes Blatt. Messungen von Frau Dr. Christine Desel (AG Krupinska, Botanik, Kiel).

weisen die gesprenkelte Oberflächenstruktur der Plastiden sowie kleinere granuläre Strukturen in den peripheren Bereichen des Cytoplasma auf ROS-Entstehung außerhalb der Plastiden hin. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf die Entstehung in den Peroxisomen. Dies würde sehr gut zu den Ergebnissen aus den biophysikalischen Messungen der Abschnitte 9 und 12.3 passen, die eine verstärkte Photorespiration bei Pathogenbefall anzeigten. Im Kontrollblatt (Abb. 14.9 B und E) kann ROS nur in den Leitbahnen oder um sie herum nachgewiesen werden. Für ein endgültiges Statement reicht jedoch die Auflösung nicht aus.

## 14.5 Infektionsverlauf mit DAB-ROS-Bildern

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, dass sich die Pilzinfektion durch ROS-Bildung im Blatt bemerkbar macht. Der hierbei eingesetzte Farbstoff DAB soll nun dazu benutzt werden, die ROS-Bildung und ihre räumliche Ausdehnung in unvergifteten und mit Inhibitoren versetzten Blättern zu studieren. Der Einsatz von Stoffwechsel-Inhibitoren ist eine weit verbreitete Methode zur Identifizierung von Reaktionswegen in lebenden Organismen. Die verwendeten Inhibitoren wurden bereits im Abschnitt 4.3 (S.29) beschrieben. Die Farbstoff-Gift-Lösungen wurden jeweils für jede Messung neu angesetzt gemäß Tabelle 14.2. Es wurde DAB für eine Endkonzentration von 5 mM hinzugefügt und dann das Messvolumen mit SM-Medium auf 1 ml aufgefüllt.

Die Infektion geschah wie in Abschnitt 4.2.3 (S. 29) beschrieben. Zur Messung wurden die gesunden oder infizierten Blätter unter Wasser abgeschnitten, damit der Transpirationsstrom nicht durch eingezogene Luft unterbrochen wurde, und für 3 h in die Beladungslösung gestellt wie in 14.1.2 beschrieben.

Die Beleuchtungsphase von 3 h fand bei Fensterlicht (Intensität ca.  $200\text{--}400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) statt. Danach wurden die Blätter in Wasser überführt und nach 18 h wie beschrieben entfärbt.

Die Bildfolgen zeigen die ROS-Entwicklung in gesunden Weizenblättern und in Blättern nach jeweils ein, zwei oder drei Tagen nach der Infektion mit *Septoria tritici*. Die Auswertung

**Tabelle 14.2:** Lösungen für Farbstoff-Messungen mit Giften

Lösung	Gift
K	Kontrolle (nur SM)
S	20 mM SHAM
A	10 $\mu$ M Antimycin
G	10 mM Glyceraldehyd
S+A	20 mM SHAM und 10 $\mu$ M Antimycin

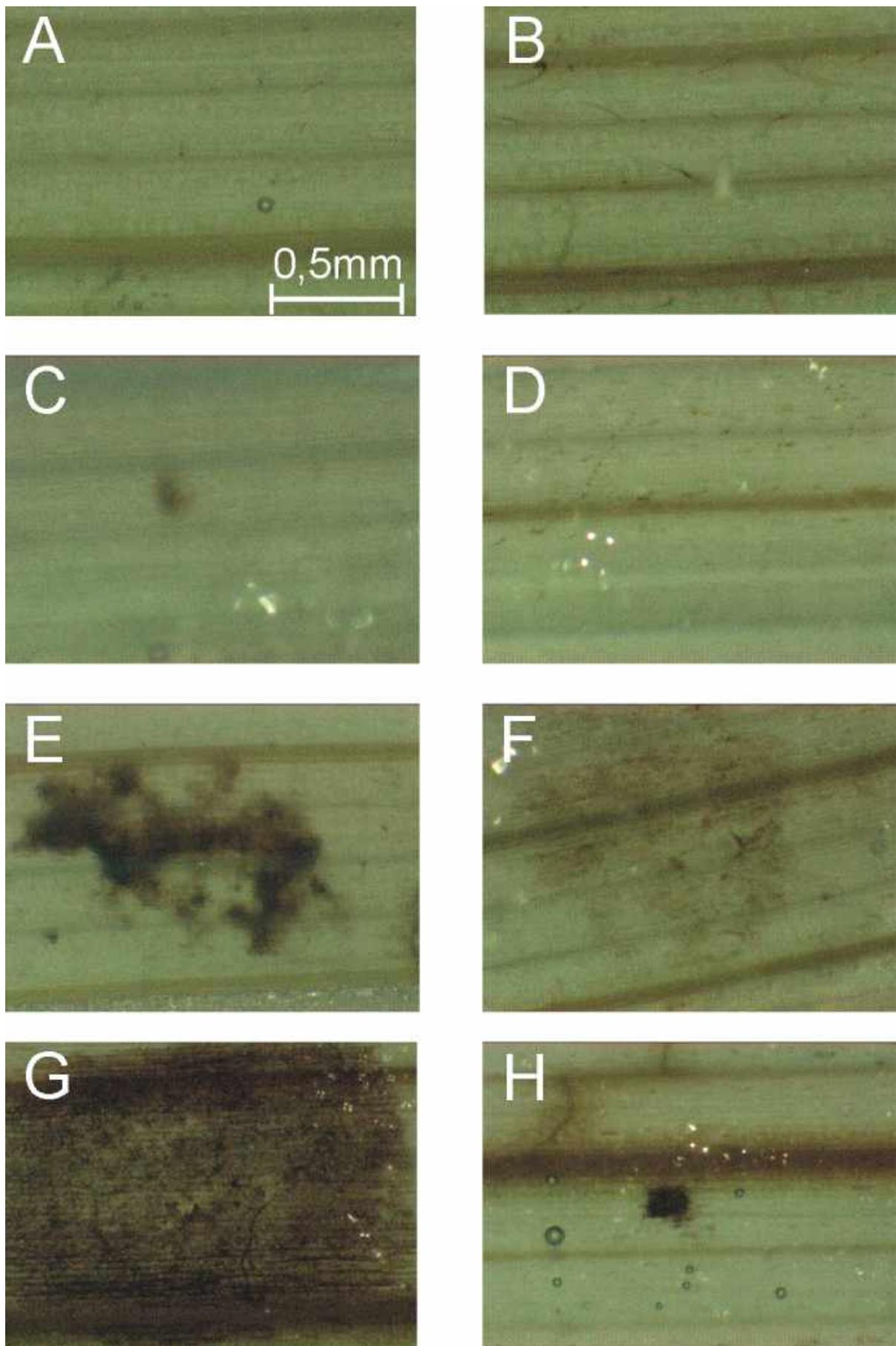
konzentrierte sich auf zwei verschiedene Bereiche der Blätter: Es gab Bereiche mit sichtbaren Infektionsherden und solche, in denen keine erkennbar waren. Aus diesem Grunde werden in einigen Abbildungen auch zwei Spalten gezeigt, die nach diesen beiden Phänomenen getrennt sind. Von den nach diesen Gesichtspunkten ausgewählten Blattstellen wurden dann im Macro-Mikroskop (siehe Abschnitt 14.3) Aufnahmen gemacht. Die Abbildungen 14.10 bis 14.13 zeigen davon typische Bilder.

### 14.5.1 Bilder des Infektionsverlaufes ohne Inhibitoren

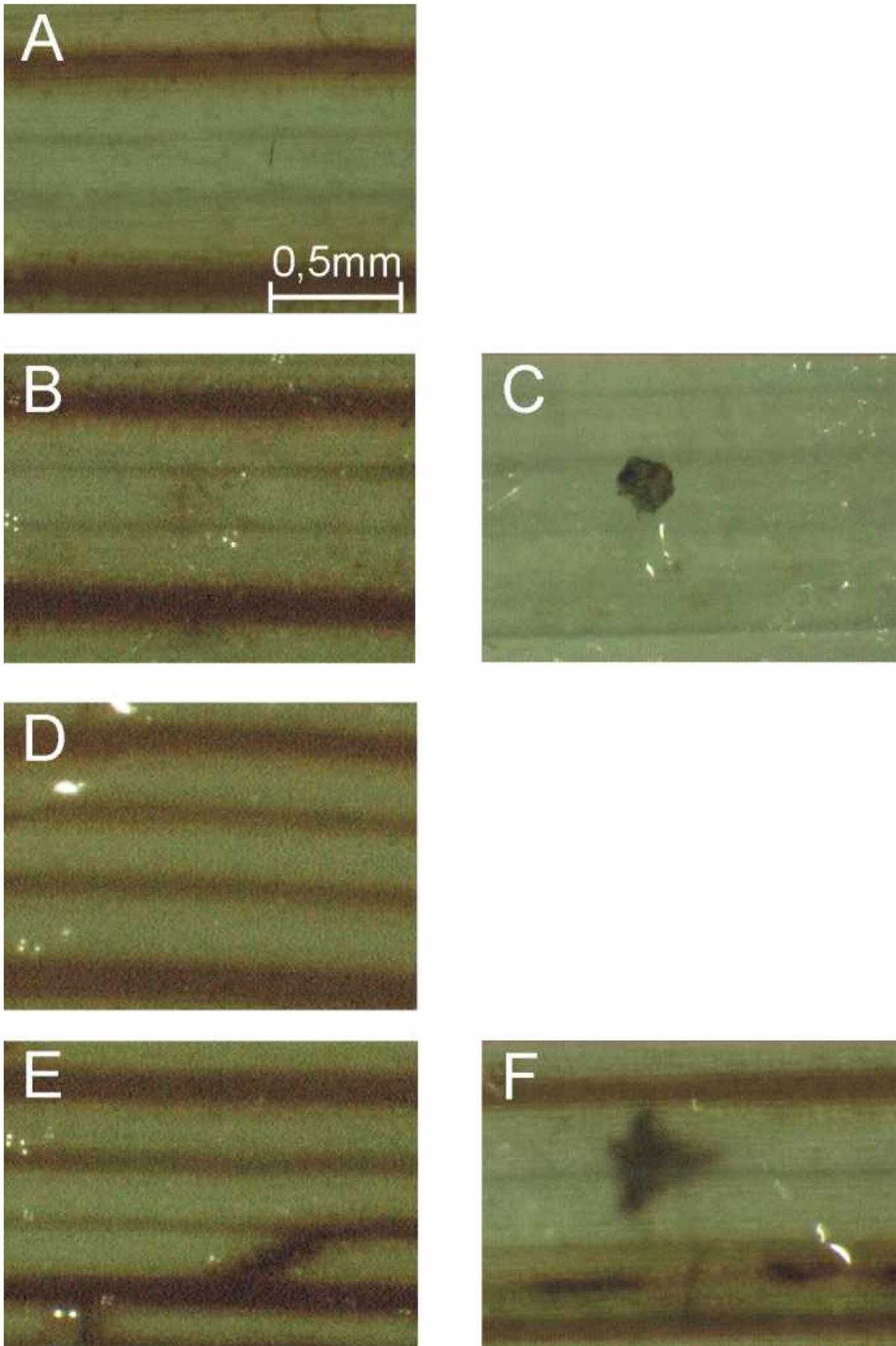
Die Abbildung 14.10 zeigt DAB-Messungen ohne Inhibitoren (Stoffwechsel-Gifte), wobei A und B die uninfizierten Kontrollen zeigen und C-H infizierte Blätter. Die Infektion geschah einen Tag (C,D), zwei Tage (E,F) oder drei (G,H) Tage vor der Messung.

Die gesunden Kontrollblätter (Abb. 14.10A,B) zeigen in den Leitbündeln eine leichte Braunfärbung, dazwischen finden sich keine sichtbaren ROS-Anzeichen. Am ersten Tag nach Infektion in Abb. 14.10C ist deutlich eine braune Stelle zu erkennen, die auf ein Infektionsereignis hindeutet. Es gibt aber auch Bilder, bei denen am ersten Tag noch keine Wirkung der Infektion zu sehen ist (14.10D). Am zweiten Tag nach Infektion (Abb. 14.10E,F) sind deutlich ausge dehnte braune Stellen zu erkennen, die auf eine fortschreitende Infektion hindeuten. Dies gilt in erster Linie für die deutlich sichtbaren Infektionsherde. Interessant ist aber auch, dass die ROS-Produktion entlang der Leitungsbahnen angeregt wird, denn jetzt treten auch die kleinen Leitungsbahnen deutlicher hervor (Vergleich von Abb. 14.10A,B mit Abb. 14.10E,F). Am dritten Tag nach Infektion findet man sowohl ein weit ausgedehntes Infektionsgebiet (14.10G) als auch starke lokale, sehr intensive Braunfärbungen (Abb. 14.10H).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Infektion mit *Septoria tritici* eine Bildung von deutlichen Braunfärbungen zur Folge hat, welche sich nicht bei gesunden Kontrollblättern finden. Also scheint die Infektion eine spezifische ROS-Erzeugung zu stimulieren, welche mit DAB in diesem System nachweisbar ist. Auch scheint die ROS-Bildung lokal begrenzt um die mutmaßliche Infektionsstelle herum zu geschehen.



**Abbildung 14.10:** Kontrolle (kein Stoffwechselgift): Weizenblätter wurden mit DAB beladen, inkubiert und entfärbt. (A,B) gesunde Blätter, (C-H) mit *Septoria tritici* infizierter Weizen: (C,D) Tag 1 nach Infektion, (E,F) 2 Tage danach, (G,H) 3 Tage nach Infektion. Bei den infizierten Blättern sind die Infektionsstellen deutlich erkennbar. Die Vergrößerung ist bei allen Bildern dieselbe.



**Abbildung 14.11:** SHAM: Weizenblätter wurden mit SHAM und DAB beladen, inkubiert und entfärbt. (A): gesundes Blatt, (B,C) mit *Septoria tritici* infizierter Weizen am Tag 1 nach Infektion, (D) infiziertes Blatt am Tag 2, (E,F) infizierte Blätter am Tag 3 nach Infektion. Bei (C) und (F) ist deutlich eine Läsion erkennbar, (B,D,E) zeigen keine Symptome. Die Vergrößerung ist bei allen Bildern dieselbe.

## 14.5.2 Bilder des Infektionsverlaufes unter SHAM

SHAM ist wie in Abschnitt 4.3 (S. 29) beschrieben ein Inhibitor der Alternativen Oxidase in den Mitochondrien (AOX), welche überschüssige Redox-Äquivalente verbrennt und damit ROS-Bildung in den Mitochondrien verhindert (Maxwell et al., 1999; Purvis, 1997; Guo et al., 2005).

Bei einer Vergiftung mit SHAM (Abb. 14.11) ergibt sich ein teilweise anderes Bild als in den Versuchen ohne Inhibitoren. Insbesondere müssen hier auf infizierten Blättern Bereichen ohne sichtbaren Infektionsherd (linke Spalte) von solchen mit Infektionsherd (rechts) unterschieden werden.

Abb. 14.11A zeigt das nicht-infizierte, aber mit SHAM inkubierte Blatt. Es erscheint etwas dunkler als die gesunden Blätter in Abb. 14.10A,B. Doch der Grundton enthält aufnahmetechnisch bedingte Schwankungen und sollte nicht absolut gesehen werden. Die wichtige Aussage steckt eher im Verhältnis der Färbung der großen und mittleren Leitungsbahnen und im Auftreten von Infektionsherden. Die linke Spalte in Abb. 14.11 zeigt als deutliches Zeichen fortschreitender Infektionsdauer (1. Tag 14.11B, 2. Tag 14.11D; 3. Tag: 14.11E) eine Erhöhung der ROS-Bildung in den kleineren Leitungsbahnen. Auch wird der Raum zwischen den Adern etwas dunkler als Wirkung des SHAM allein oder in Kooperation mit der Infektion. Bei dem gesunden Blatt (Abb. 14.11A) sind auch, wie schon bei der Kontrolle (Abb. 14.10A,B), nur die Leitbündel zu sehen, aber hier unter SHAM sind diese deutlich dunkler. Auch bei den infizierten Blättern ohne erkennbare Reaktion (Abb. 14.11B,D,E) sind nur die Leitbündel stärker gefärbt. Bei der Blattstelle mit sichtbarem Infektionsherd (Abb. 14.11C) sieht das Bild anders aus: Hier ist genau wie bei den infizierten Blättern ohne Inhibitoren (Abb. 14.10 E-H) jeweils eine deutliche Läsion erkennbar, an der offenbar die Infektion stattgefunden und sich verbreitet hat. Der stärkste Unterschied gegenüber den nicht-vergifteten infizierten Blättern in Abb. 14.11E-F liegt im Umfeld des in Abb. 14.11C sichtbaren Infektionsherdes: Dieser Bereich ist am 1. Tag deutlich heller geworden.

Am dritten Tag nach Infektion (Abb. 14.11F) verschwindet die Aufhellung um den Infektionsherd. Die Fläche ist etwas dunkler als bei dem nicht-infizierten SHAM-Blatt (Abb. 14.11A), aber die Anfärbung der mittleren Leitungsbahnen ist noch immer geringer als bei den infizierten Blättern der linken Spalte von Abb.14.11. Es scheint so, dass unter SHAM die Pflanze all ihre Abwehrkraft auf den Infektionsherd konzentriert. Dass SHAM, das das Sicherheitsventil in den Mitochondrien, die AOX, blockiert, zur Erhöhung der ROS-Bildung führt, mag auf den ersten Blick nicht verwundern, eher schon die beobachtete Abnahme der Braunfärbung in Abb. 14.11C.

### 14.5.3 Bilder des Infektionsverlaufes unter Glyceraldehyd

Glyceraldehyd inhibiert, wie in Abschnitt 4.3 (S.29) beschrieben, die RubisCO, das für die CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Bindung zuständige Enzym des Calvin-Zyklus (siehe Abschnitt 3.2.4, S.15). Dies kann zur Überreduktion der photosynthetischen Elektrodentransportkette führen und ROS erzeugen (Hoffmann et al., 2005). Bilder vom Infektionsverlauf in Blättern, die mit Glyceraldehyd vergiftet wurden, finden sich in der Abb. 14.12: Gesunde Kontrolle 14.12A; Messung am Tag 1 bis 3 nach Infektion in B,C bzw. D,E bzw. F,G. Wieder zeigt die linke Spalte (Abb. 14.12A,B,D,F) solche Blätter ohne sichtbaren Infektionsherd und die rechte (Abb. 14.12C,E,G) solche mit deutlichem Infektionsherd.

In dieser Umgebung beginnt die erhöhte ROS-Bildung bereits am ersten Tag der Infektion (Abb. 14.12C). Die Aufhellung des Umfeldes wie bei SHAM (Abb. 14.11C) ist an den ersten beiden Tagen nicht zu erkennen. Allerdings könnte ein leichter Aufhellungseffekt in der Umgebung der Infektionsstelle sich aus dem Vergleich von Abb. 14.12F und Abb. 14.12B ergeben. Möglicherweise bedeutet der sehr lokalisierte und geschrumpfte Infektionsherd in Abb. 14.12G auch, dass der Pilz besiegt wurde.

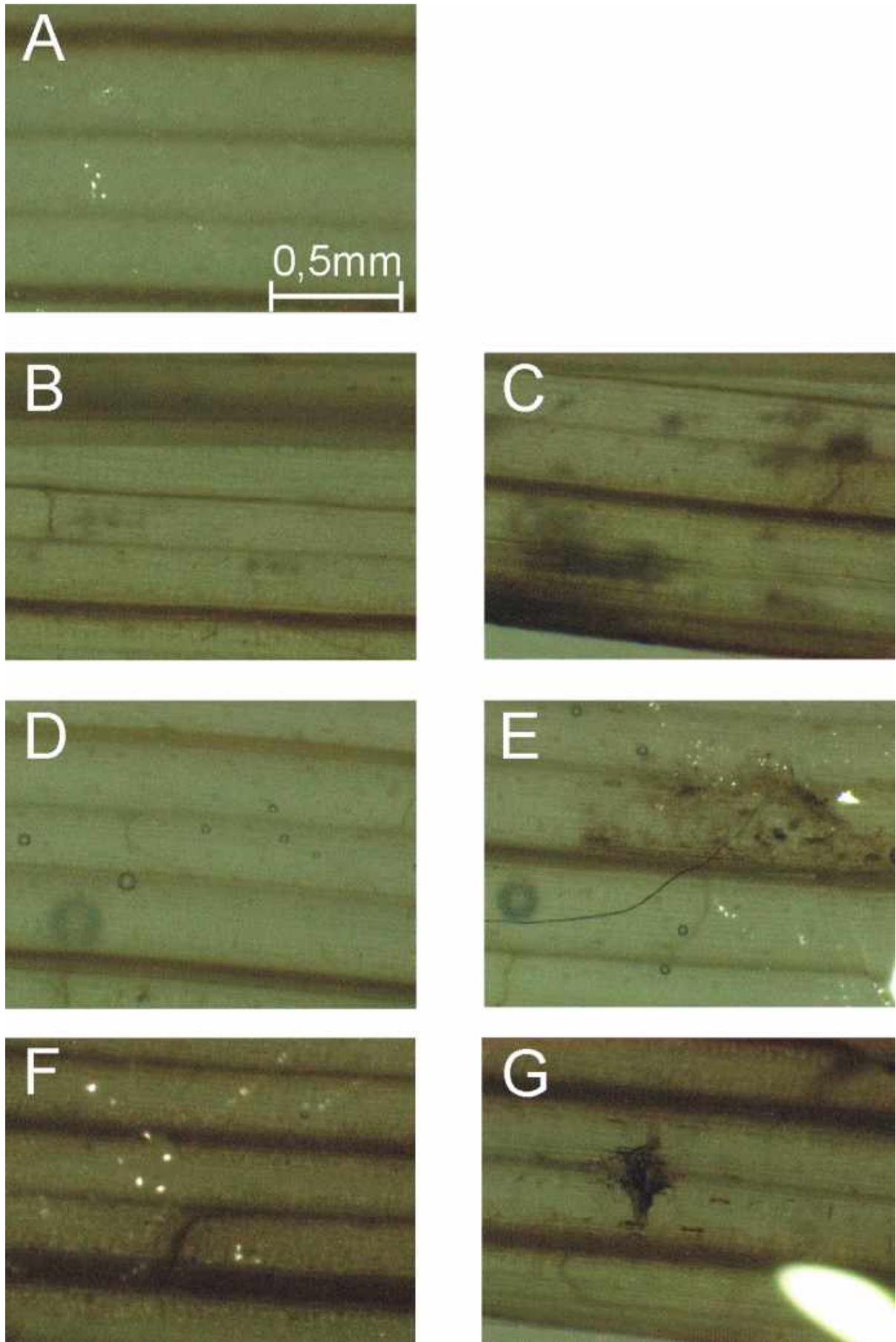
### 14.5.4 Detailfragen der ROS-Bilder unter SHAM und Glyceraldehyd

In den oben berichteten Messungen war als besonders interessanter Effekt herausgehoben worden, dass in den SHAM-Messungen im Umkreis des Infektionsherdes eine Reduzierung der ROS-Bildung auftritt im Gegensatz zu Blattstellen, die entfernter vom Infektionsherd liegen. Um dieses Ergebnis zu unterstützen, konzentrierte eine neue Messreihe sich auf diesen Vergleich: In den Bildern der Abb. 14.13 ist die Grünfärbung schwächer geworden, weil die Blätter in der Entfärbelösung gelagert wurden. Auf die Interpretation, die sich nur auf die braunen Ablagerungen des DAB stützt, sollte dies keinen Einfluss haben.

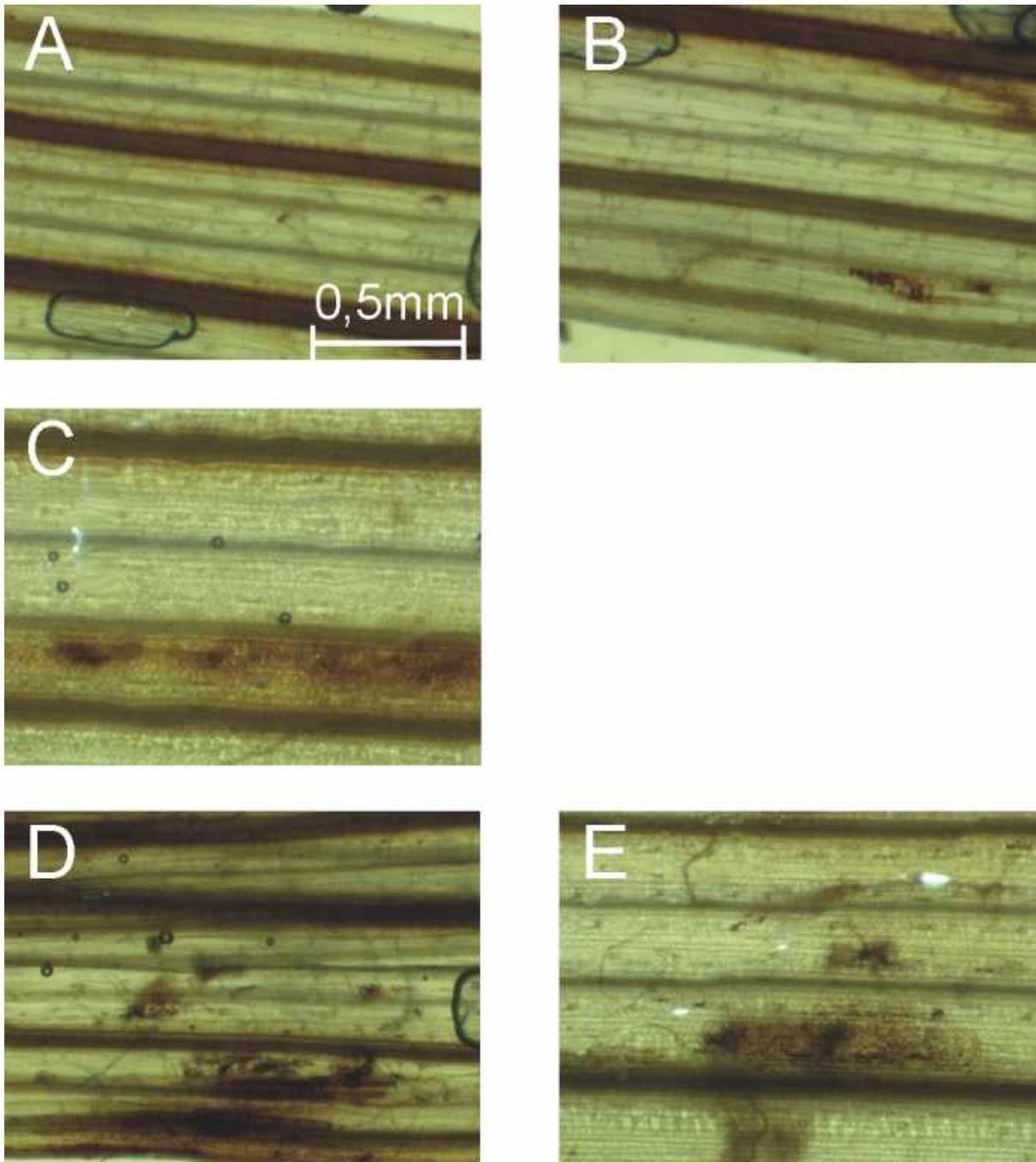
Die Bilder 14.13A und B zeigen zwei Stellen desselben vor einem Tag infizierten und mit SHAM vergifteten Blattes. Die sichtbaren Blasen (die rund umrandeten Gebiete) lassen die räumliche Zuordnung erkennen. Abb. 14.13A zeigt eine Stelle ohne sichtbaren Infektionsherd, bei der, wie schon oben gezeigt, die Leitbündel stark gefärbt sind. In Abb. 14.13B hingegen ist ein Infektionsherd sichtbar, und die Leitbündel sind deutlich heller. Da sich diese beiden Stellen auf dem selben Blatt in unmittelbarer Nachbarschaft befinden (im Gegensatz zu den Bildern aus Abb. 14.11B, C), kann man hier davon ausgehen, dass die unterschiedlichen Helligkeitswerte nicht auf Beladungseffekte zurückzuführen sind. Damit zeigen Abb. 14.13A und B besonders deutlich, dass unter SHAM tatsächlich Blattstellen mit einer Infektion in ihrem Umfeld die ROS-Bildung unterdrücken, während Blattstellen, die nur wenig entfernter liegen und uninfiziert erscheinen, mit einer ROS-Erhöhung antworten.

Das Bild 14.13C aus dieser Messreihe bestätigt noch einmal, dass am 3. Tag der Infektion unter SHAM auch in der Umgebung der Infektionsherde die ROS-Erzeugung stark angestiegen ist.

Messungen der gleichen Reihe zeigen erneut den Unterschied zwischen SHAM- und Glyceraldehyd-Wirkung. In den Abbildungen 14.13D und E findet sich je ein Blatt am Tag 1 und 2 mit Glyceraldehyd-Vergiftung, welche sich offenbar anders als SHAM auswirkt, da hier auch die Zwischenbereiche trotz Anwesenheit des Infektionsherdes dunkel sind.



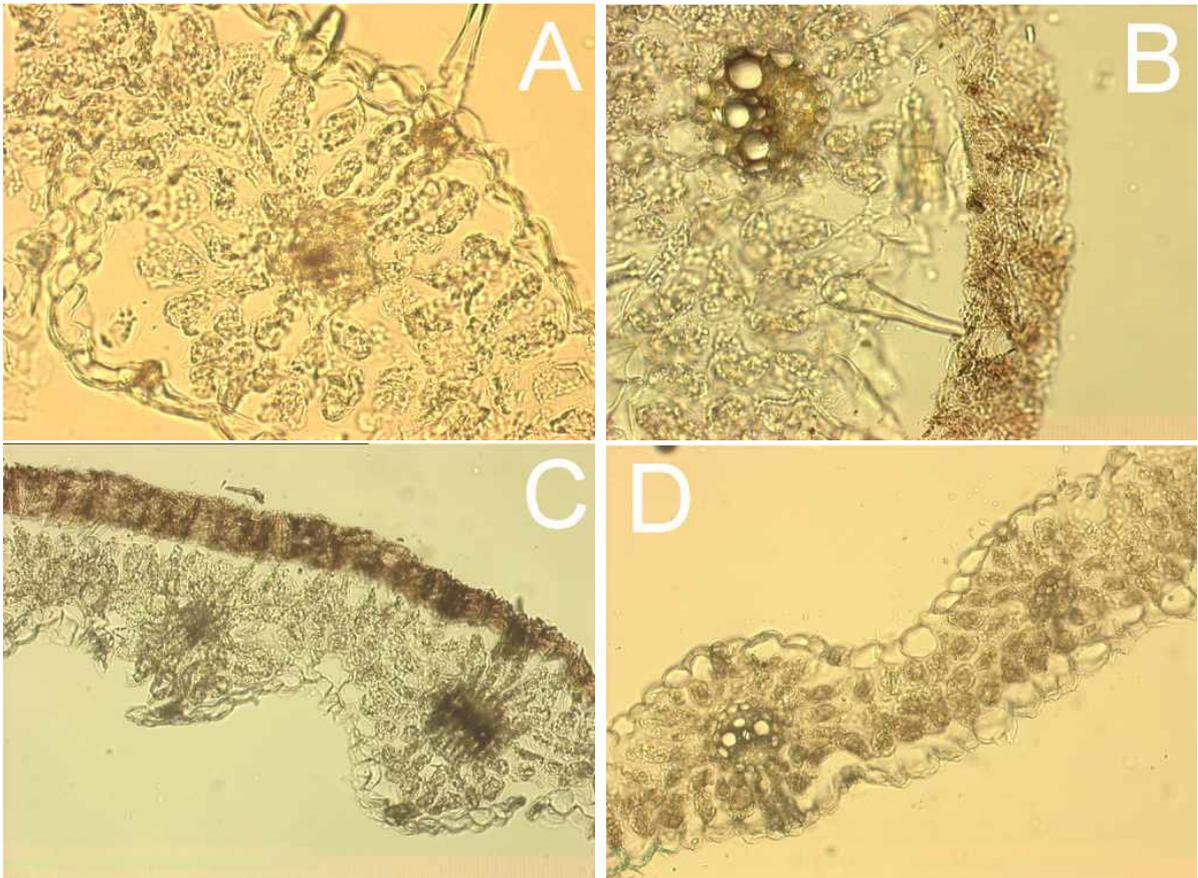
**Abbildung 14.12:** *Glyceraldehyd:* Weizenblätter wurden mit Glyceraldehyd und DAB beladen, inkubiert und entfärbt. (A): gesundes Blatt, (B,C) mit *Septoria tritici* infizierter Weizen am Tag 1 nach Infektion, (D,E) infizierte Blätter am Tag 2, (F,G) infizierte Blätter am Tag 3 nach Infektion. Bei (C,E,G) ist deutlich eine Läsion erkennbar, (B,D,F) zeigen keine Symptome. (E) zeigt zusätzlich eine Pilzhyphe. Die Vergrößerung ist bei allen Bilder dieselbe.



**Abbildung 14.13:** *Detailfragen: Weizenblätter wurden mit DAB und mit (A-C) SHAM bzw. (D,E) Glycerinaldehyd beladen, inkubiert und entfärbt. (A,B) mit SHAM und am Tag 1 nach der Infektion mit *Septoria tritici*: zwei Stellen direkt nebeneinander auf demselben Blatt (erkennbar an den Blasen), (A) ohne Läsion, (B) mit Pilzbefallsstelle. (C) mit SHAM am Tag 3 nach der Infektion, (D) mit Glycerinaldehyd am Tag 1 nach Infektion, (E) am Tag 3 nach Infektion. Die Vergrößerung ist bei allen Bildern die selbe. Die Bilder dieser Abbildung sind deutlich weniger grün als die aus 14.10 bis 14.12. Dies liegt daran, dass die Bilder hier zu einem späteren Zeitpunkt gemacht wurden. Dazwischen lagerten die Blätter weiter in der Entfärbelösung, wodurch noch vorhandene Chlorophyll-Reste weiter ausgedünnt wurden. Dies beeinflusst aber nicht den Nachweis-Farbstoff.*

### 14.5.5 Detailaufnahmen einiger ROS-Quellen

Um genauer die Quelle der ROS-Erzeugung feststellen zu können, wurden einige Blattstellen wie schon oben beschrieben unter dem Mikroskop im Hellfeld analysiert. Dazu wurden die Blätter in ein entsprechendes Medium eingebettet („Einbettmedium“, Jung, Leica Instruments, Heidelberg), eingefroren und in 50  $\mu\text{m}$  dünne Scheiben geschnitten. Die Abbildung 14.14 zeigt einige Aufnahmen.



**Abbildung 14.14:** Weizenblätter wurden mit DAB beladen, inkubiert und entfärbt. Die Bilder zeigen jeweils einen Gefrierschnitt unter dem Mikroskop: (A) gesundes Blatt ohne Stoffwechselgift, (B) am Tag 1 nach Infektion, (C) am Tag 2 nach Infektion, jeweils ohne Stoffwechselgift, (D) gesundes Blatt mit Glycerinaldehyd.

Bei dem gesunden Blatt (Abb. 14.14A) zeigen sich nur braune, ROS-anzeigende Ablagerungen im Bereich der Leitbündel. Dort findet sich auch Farbstoff bei den infizierten Blättern (Abb. 14.14B,C), aber nun ist auch die obere Epidermis braun gefärbt. Die Abb. 14.14C zeigt einen Schnitt durch den braunen Fleck, der schon in der Abb. 14.10E zu sehen war. Die dort gefundenen Stellen verstärkter ROS-Bildung finden sich also nur auf der oberen Epidermis und nicht tiefer im Blatt. In Abb. 14.9 (S. 143) jedoch tritt die ROS-Bildung nach Infektion nur im Gewebe auf. Offensichtlich gibt es hier verschiedene Phenotypen. Unter welchen Bedingungen diese auftreten, bleibt indes unklar.

Abb. 14.14D zeigt einen Schnitt durch ein Blatt mit Glycerinaldehyd. Hier zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle (A) eine leichte ROS-Bildung, welche über das ganze Blatt verteilt ist, weil die Hemmung der Photosynthese in allen Zellen geschieht.

### 14.5.6 Zusammenfassung

Aus den Farbstoff-Messungen mit DAB in diesem Abschnitt ergibt sich das folgende Bild für den Zusammenhang zwischen Infektion, ROS-Bildung und Inhibitorwirkung:

- Gesunde, nicht infizierte Blätter haben eine schwache, mit DAB nachweisbare ROS-Erzeugung, die sich auf die großen Leitbündel beschränkt.
- Die Infektion unvergifteter Blätter mit *Septoria tritici* induziert eine deutlich stärkere ROS-Bildung, welche aber eng begrenzt bleibt um die vermutlichen Infektionsherde. Dieser infektionsbedingte Anstieg findet sich auch weiter hinten in Abb. 14.17A im Sockel der DCF-Messungen.
- SHAM in gesunden Pflanzen erzeugt bereits eine erhöhte ROS-Bildung (Abb. 14.11 linke Spalte). Dies ist als Folge der Hemmung der Alternativen Oxidase zu erwarten.
- Erfolgt nun eine Infektion bei SHAM-vergifteten Blättern, so sieht das Bild völlig anders aus: Blattbereiche im Umfeld eines Infektionsherdes verhalten sich anders als entferntere, scheinbar unbefallene Blätter. Die in der Umgebung senken, besonders deutlich am 1. Tag der Infektion, die ROS-Erzeugung und konzentrieren sie auf den Infektionsherd, die entfernteren zeigen eine Erhöhung. Hier wäre zu untersuchen, ob über eine Signaltransduktion die befallenen Blattstellen die unbefallenen in der näheren Umgebung „warnen“ (Heil und Bostock, 2002; Neill et al., 2002b,a).
- Wie bei SHAM scheint die Vergiftung mit Glycerinaldehyd bereits im gesunden Blatt die ROS-Erzeugung zu erhöhen. Auch dies ist zu erwarten, da die Hemmung des Calvin-Zyklus zu einer Überreduktion der photosynthetischen Elektronentransportkette und damit zur ROS-Erzeugung führen kann (Hoffmann et al., 2005).
- Der Infektionsverlauf unter Glycerinaldehyd zeigt bei Blattstellen ohne sichtbaren Infektionsherd eine starke, aber um zwei Tage verzögerte ROS-Entwicklung. Mit sichtbarem Infektionsherd ist die ROS-Entwicklung von Anfang an stark, und ein Unterdrückungseffekt im Umfeld wie bei SHAM könnte allenfalls am 3. Tag in die Bilder hineininterpretiert werden.

## 14.6 ROS-Entwicklung nach 5-stündiger Vorbeleuchtung

In den folgenden Versuchen soll der Zeitverlauf der ROS-Bildung und insbesondere die Lichtwirkung untersucht werden. DAB, das bei Kontakt mit ROS ausfällt, ist für ein kontinuierliches Monitoring nicht geeignet. Deshalb kommt jetzt der Fluoreszenzfarbstoff DCF zum Einsatz.

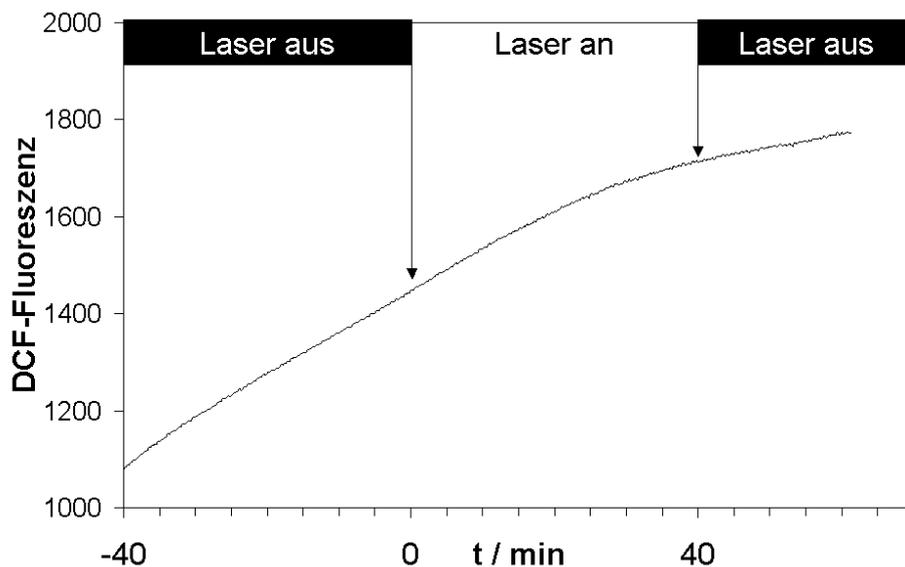
Im vorigen Abschnitt hatte sich in den Bildern der Abbildungen 14.10 bis 14.13 eine ungleichmäßige Farbstoffablagerung gezeigt. Deshalb erfolgt die Konzentration hier auf die hell fluoreszierenden Stellen, also auf die Infektionsherde, und es wird die zeitaufgelöste, lichtinduzierte ROS-Entwicklung studiert.

Es wurden zwei Versuchsprotokolle angewandt: Im ersten war die ROS-Entwicklung unter stationären Lichtbedingungen (5 h Vorbeleuchtung) zu untersuchen, im zweiten (Abschnitt 14.7) das Einschaltverhalten nach Intensitätswechsel.

Zum Nachweis der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies wurde der im Abschnitt 14.2 beschriebene Fluoreszenz-Mikroskop-Aufbau verwendet, um DCF-Fluoreszenz zu messen (siehe Abschnitt 14.1.1). Die Weizenpflanzen wurden, wie in 4.1.2 aufgeführt, im eigenen Institut angezogen und waren bei der Messung zwischen 13 und 18 Tagen alt. Die Infektion mit *Septoria tritici* erfolgte, wie in 4.2.3 beschrieben, und fand zwischen einem und vier Tagen vor der Messung statt.

### 14.6.1 Lichtstabilität von DCF

Um auszuschließen, dass bei den folgenden Versuchen der Farbstoff DCF selbst vom Licht oxidiert wird, wurde ein Tropfen DCF-DA auf die Petrischale des Mikroskops gegeben (siehe Abschnitt 14.2). Die Abbildung 14.15 zeigt die gemessene DCF-Fluoreszenz. An den bezeichneten Punkten wurde das starke Laserlicht mit dem Umlenkspiegel ein- und wieder ausgeschaltet.



**Abbildung 14.15:** DCF-Fluoreszenz eines Tropfens der Lösung ohne Blatt. An den gekennzeichneten Punkten wurde das Laserlicht an- bzw. ausgeschaltet.

Die in der Schale befindliche DA-Form des Farbstoffes leuchtet nicht. Dass sich dennoch ein Anstieg in der Fluoreszenz zeigt, liegt an den wohl in der nicht ganz sauberen Schale vorhandenen Esterasen, die DCF-DA in DCF umgewandelt haben. Da dies nicht sofort geschieht, ergibt sich der Anstieg. Wichtig für die Aussage hier ist allerdings, dass sich weder beim Einschalten noch beim Ausschalten des aktinischen Lichtes ein Knick in der Kurve ergibt. Dies bedeutet, dass der Farbstoff selbst nicht auf das starke Laserlicht reagiert.

### 14.6.2 Beladung der Pflanzen mit Farbstoff und Giften, Messablauf

Auch hier wurden die beschriebenen Stoffwechsellinhibitoren eingesetzt, gemäß Tabelle 14.2 jeweils unter Zugabe von 60  $\mu\text{mol}$  DCF-DA.

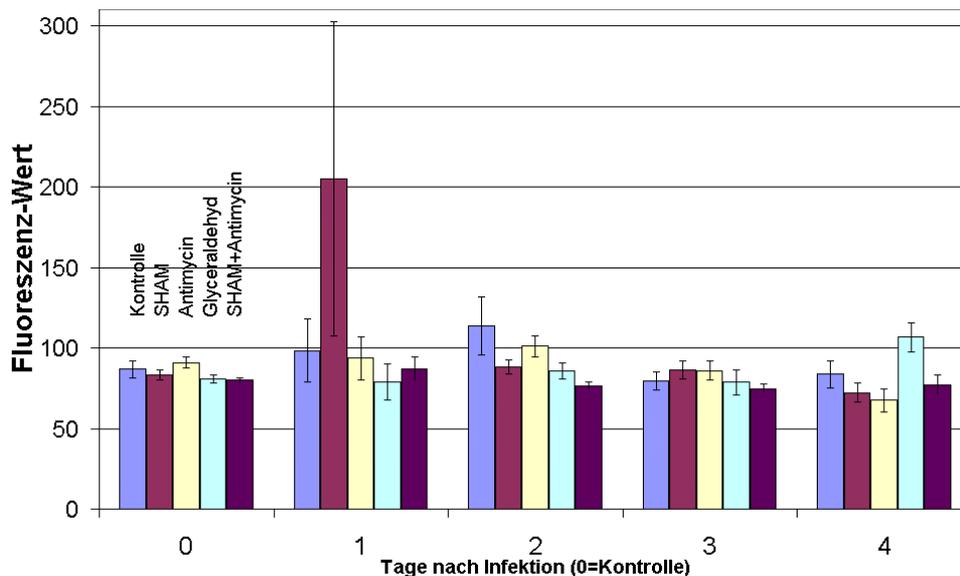
Die Weizenblättchen wurden dann wie schon bei den Versuchen zuvor unter Wasser abgeschnitten und in die jeweiligen Lösungen gestellt. Den Blättern wurde bei Tageslicht ca. 4-7 Stunden Zeit gegeben, die Lösung aufzunehmen. Danach erfolgte die Messung.

Nach der Beladung mit dem Farbstoff und den Giften wurde jeweils ein Blatt, wie im Abschnitt 14.2 beschrieben, auf dem Mikroskop plaziert. Nach einer kurzen Akklimatisierungsphase in Dunkelheit erfolgte dann die Aufnahme eines Fluoreszenz-Bildes mit der Kamera (Belichtungszeit: 50 ms, Objektiv: 4x). Auf diese Weise wurde von jedem Blatt ein Bild von einer Blattstelle ca. 4 cm vom unteren Blattende aufgenommen.

Da die Fluoreszenz sehr ungleichmäßig ist, wurde auf den Bildern jeweils ein kleiner Bereich maximaler Helligkeit markiert (ROI; Größe des Bereichs: ca. 1000 bis 3000 Bildpunkte), und der Mittelwert über die Werte der Bildpunkte wurde berechnet.

### 14.6.3 Ergebnisse

Die nach obigem Messablauf erhaltenen Messwerte wurden über verschiedene Messungen bei den jeweils gleichen Bedingungen (Gift, Infektion) gemittelt und der Standardfehler des Mittelwertes errechnet. Die Abbildung 14.16 zeigt diese Werte sortiert nach den Tagen der Infektion, wobei „Tag 0“ die uninfizierte Kontrolle darstellt.



**Abbildung 14.16:** Mittelwerte der nach 5-stündiger Vorbeleuchtung gemessenen DCF-Fluoreszenzsignale bei gesunden Weizenblättern (Tag 0 auf der x-Achse) und mit *Septoria tritici* vor einem bis vier Tagen infizierten (x-Achse), Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Die Blätter wurden zuvor über den Transpirationsstrom mit dem Farbstoff und den an den Säulen angegebenen Giften (Konzentration: siehe Text) beladen. Lichtintensität: 200-400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Tageslicht).

Die große Fehlerstreuung ergibt sich daraus, dass die Produktion von ROS nicht allein der Infektion bzw. der Giftwirkung zuzuschreiben ist, sondern auch anderen Prozessen. Hinzu kommt, dass die Präparation (Abschneiden, Beladen, Einbau in die Messanlage) des Blattes für die Messung, obwohl diese so schonend wie möglich erfolgte, natürlich auch Prozesse im Blatt auslöst,

die ROS erzeugen können (Razem und Bernards, 2003). Deshalb wurden die Werte gemittelt, um diese stochastischen Störungen zu eliminieren.

Bei gesunden Blättern (linke Säulengruppe in Abb. 14.16) ergeben sich keine nennenswerten Unterschiede in der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Entwicklung. Anders sieht es am 1. Tag nach Infektion aus: Es wird nun unter SHAM-Einfluss mehr als doppelt soviel  $\text{H}_2\text{O}_2$  wie bei der Kontrolle produziert und bei Glyceraldehyd etwas weniger. Am Tag 2 und 3 sind kaum Unterschiede sichtbar, wohingegen am Tag 4 die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Entwicklung bei Glyceraldehyd gegenüber der Kontrolle verstärkt ist.

## 14.7 Licht-induzierte ROS-Entwicklung

Ging es im Abschnitt 14.6 darum, eine Wirkung der Pilzinfektion unter stationären Lichtbedingungen zu studieren, so soll nun der Einfluss des Einschaltens der Photosynthese auf die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  näher betrachtet werden.

In den Messungen der Abbildung 14.16 waren interessante Änderungen nur bei den Giften SHAM und Glyceraldehyd zu beobachten gewesen, weshalb die folgenden Versuche nur für diese durchgeführt wurden.

### 14.7.1 Messablauf

Während der Beladung mit dem Farbstoff und den Giften (siehe Tabelle 14.2, nur *Kontrolle*, *SHAM* und *Glyceraldehyd*) standen die Blätter jeweils für 2 Stunden in Dunkelheit. Dann wurde das Blatt entsprechend der Beschreibung im Abschnitt 14.2 im Mikroskopaufbau befestigt und entweder die Blendenfolie mit dem Loch über dem Blatt plaziert (für die Messungen bei viel Licht) oder die Lichtleitfaser vorsichtig mit dem Mikromanipulator auf das Blatt abgesenkt, so dass sie dieses gerade berührt (wenig Licht). Danach wurde der folgende Messablauf gestartet (in Klammern die Daten für die Messung mit der Lichtleitfaser):

1. nur bei Messlicht (integriert  $0,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) alle 12 Sekunden eine Messung für 50 (60) Minuten,
2. nach 1 h Dunkelheit Beleuchtung mit dem Laser mit einer Intensität von  $670\text{--}890 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $150\text{--}200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) für 40 (30) Minuten, weiterhin alle 12 s eine Messung,
3. nach Ausschalten des Lasers weitermessen nur bei Messlicht (integriert  $0,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) noch 20 Minuten, alle 12 s eine Messung.

### 14.7.2 Auswertung

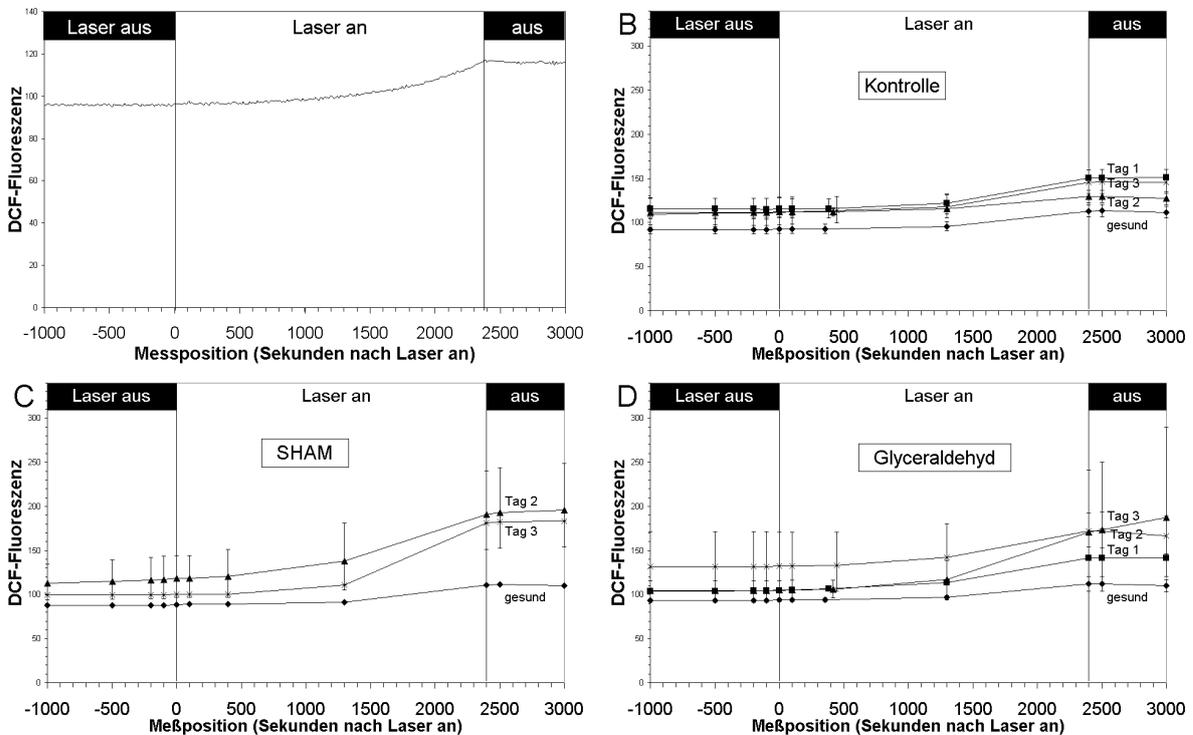
Jede Messung lieferte einen „Film“ von 110 Minuten mit einer Messung pro 12 Sekunden. Zur Auswertung wurden per Software auf den Bildern zwei bis drei Stellen markiert. Das zugehörige Programm berechnete dann zu jeder dieser Stellen die Mittelwerte des Fluoreszenz-Signales für alle Einzelbilder einer Messserie. Dabei ergaben sich Messungen, wie in Abb. 14.17A als Beispiel gezeigt. An ausgewählten Zeitpunkten wurden die Flächenmittelwerte der Einzelbilder aus den Messserien entnommen. Diese Werte wurden danach nach gleichen Bedingungen (Gifte, Tage der Infektion) logarithmisch gemittelt. Die Zeitachsen in den Abbildungen beziehen sich immer auf den Zeitpunkt „Laser an“.

### 14.7.3 Ergebnisse der Messungen mit Starklicht

Wie oben beschrieben, wurden die nach Abschnitt 4.1.2 (S.25) gezogene Weizenblätter mit *Septoria tritici* infiziert, mit DCF-DA beladen; und dann wurde mit dem Mikroskopaufbau die Fluoreszenz gemessen. Als aktinische Lichtquelle kam in diesem Abschnitt der Laser direkt mit Umlenkspiegel und Blendenfolie zum Einsatz, so dass sich eine wirksame Lichtintensität von  $670 - 890 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ergab (siehe Abschnitt 14.2.3).

### Licht-induzierter ROS-Anstieg

Abbildung 14.17A zeigt eine typische Messkurve, und in 14.17B-D finden sich die Zeitverläufe der ROS-Entwicklung vor, während und nach Beleuchtung mit dem Laser für die Kontrolle (B) und die beiden Gifte (C,D) als Mittelwerte. Abbildung 14.18 stellt dieselben Messergebnisse dar, nur sind dort die Daten nicht nach Giften, sondern nach Tagen nach Infektion zusammengefasst.

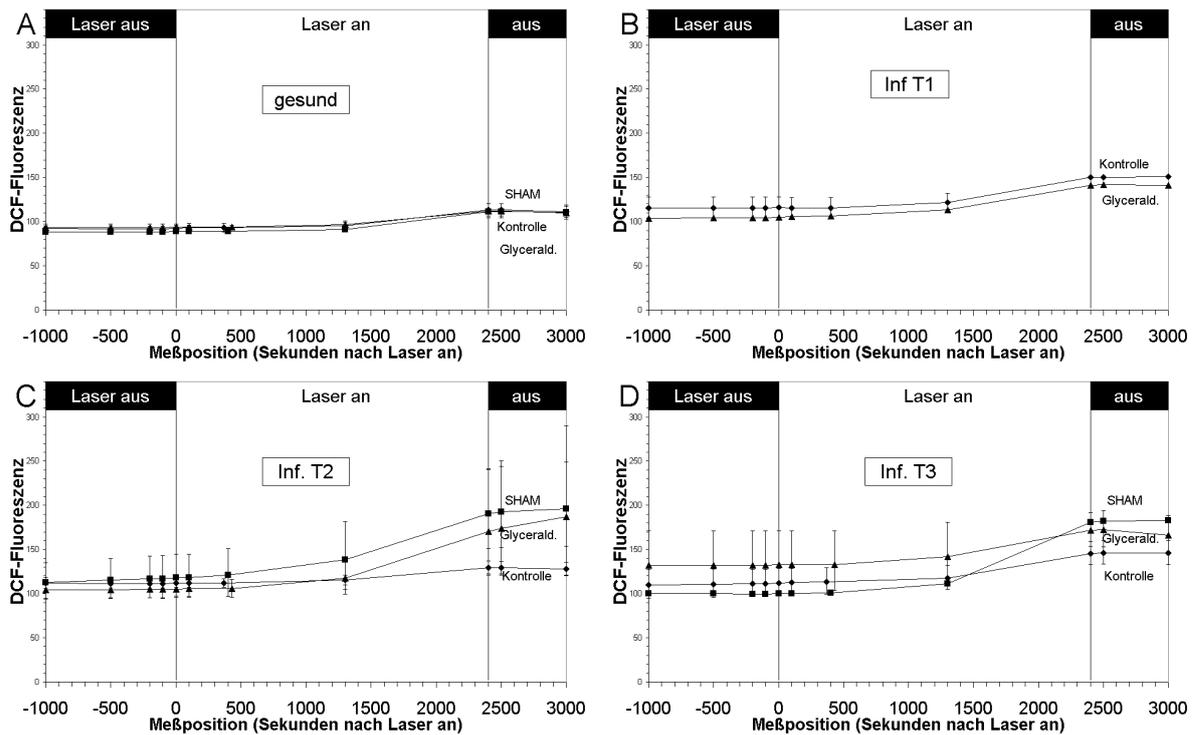


**Abbildung 14.17:** Zeitverläufe der lichtinduzierten ROS-Entwicklung: (A) zeigt eine typische Messung, (B-D) Mittelwerte nach verwendeten Giften: (B) Kontrolle (SM), (C) SHAM, (D) Glycerinaldehyd. Gleiche Messdaten wie in Abb. 14.18. Aktinisches Licht:  $670\text{--}890\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$  (Starklicht). Das Messlicht wurde bei  $-3000\ \text{s}$  eingeschaltet. Mittelwerte über 1–5 Messungen. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Die Punkte bei  $400\ \text{s}$  sind etwas verschoben, damit die Streuung besser sichtbar wird.

Bei Abb. 14.17A ist ein deutlicher licht-induzierter Anstieg der Fluoreszenz und damit der ROS-Bildung nach dem Einschalten des Laser zu erkennen. Auffällig ist die lange Verzögerung von ca.  $1000\ \text{s}$ . Nach dem Ausschalten bleibt die Fluoreszenz in den meisten Fällen weitgehend konstant.

Neben diesem Kurvenverlauf zeigt das Kapitel 15 in Abb. 15.2 eine Kurve, die sich durch einen Fluoreszenz-Anstieg bereits im Dunkel bemerkbar macht und die besonders unter SHAM häufig zu finden war. Solche Kurven wurden für die Auswertung dieses Abschnittes nicht verwendet, da sich hierbei der Anstieg als Reaktion auf Licht nicht klar bestimmen ließ. In den Abbildungen 14.17C und 14.18B fehlt deshalb auch jeweils eine Kurve, weil unter deren Bedingung keine Messung den Verlauf aus Abb. 14.17A zeigte.

Vergleicht man die Fluoreszenz verschiedener Infektionstage bei gleichen Giften miteinander (Abb. 14.17), so erkennt man für die unvergiftete Kontrolle (14.17B), dass die Reaktion auf das Laserlicht bis auf Tag 2 identisch ist. Der Sockel an ROS hingegen ist bei unvergifteten, infizierten Blättern deutlich größer als beim gesunden. Diese Aussage kommt hier etwas deutlicher als bei den Messungen in Abb. 14.16 heraus. Dies kann an verschiedenen Beleuchtungsbedingungen während der Beladung liegen (im „Sockel“, 14.16:  $300\text{--}400\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ , 14.17: Dunkelheit und danach  $1\ \text{h}$  Messlicht von  $1\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ).



**Abbildung 14.18:** Zeitverläufe der lichtinduzierten ROS Entwicklung sortiert nach Tagen nach der Infektion: (A) gesunde Weizenblätter und mit *Septoria tritici*, vor (B) einem, (C) zwei oder (D) drei Tagen infiziert. Die Blätter wurden ca. 3 Stunden vor dem Zeitpunkt 0 über den Transpirationsstrom mit dem Farbstoff und den angegebenen Giften (Konzentration: siehe Tabelle 14.2) beladen. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der Fluoreszenzsignale von DCF-DA mit HL ( $670\text{--}890\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) an. Es wurden 1–4 Messungen pro Datenpunkt gemittelt. Die Punkte bei 400 s sind etwas verschoben, damit die Streuung besser sichtbar wird. Gleiche Messdaten wie in Abb. 14.17.

Ein Vergleich dieser Parallelverschiebung der Zeitverläufe mit den Bildern in Abb. 14.10 zeigt, dass der Trend zumindest bei den ersten beiden Infektionstagen ähnlich ist, nämlich dass das ROS-Niveau mit der Infektion steigt.

Bei SHAM (Abb. 14.17B) ist der Anstieg nach Einschalten des Lichtes bei allen infizierten Blättern größer als bei der gesunden Kontrolle, und der Sockel ist bis auf Tag 1 auch höher. Unter Einfluss von Glyceraldehyd (Abb. 14.17C) unterscheiden sich die Anstiege der Kontrolle und des ersten Tages kaum, die anderen sind stärker. Der Sockel ist an den ersten beiden Tagen etwas höher und am dritten Tag deutlich höher als bei den gesunden Blättern.

Bei den gesunden Kontrollblättern (Abb. 14.18A) ist kein Unterschied im Fluoreszenzanstieg zwischen den verschiedenen Giften erkennbar. Am ersten Tag nach der Infektion (Abb. 14.18B) sind Kontrolle (SM) und Glyceraldehyd noch gleich bis auf einen unterschiedlichen konstanten Sockel, der bei letzterem etwas geringer ist. SHAM hingegen zeigt nicht nur eine stärkere Reaktion auf Licht, sondern auch einen Anstieg im Dunkeln.

In Abb. 14.17/14.18 treten Unterschiede im Sockel unter mehr Bedingungen hervor als in Abb. 14.16.

Am zweiten Tag (Abb. 14.18C) steigt die licht-induzierte Fluoreszenz sowohl bei SHAM als auch bei Glyceraldehyd deutlich stärker an als die Kontrolle. Am Tag 3 nach der Infektion (Abb. 14.18D) ist der licht-induzierte Anstieg bei SHAM immer noch deutlich stärker, wohingegen die Kontrolle und Glyceraldehyd wieder etwa einen gleichgroßen Zuwachs haben. Unterschiedlich ist allerdings der Sockel, deutlicher als am Tag 1 und auch mit gegensätzlichem Verhalten von Kontrolle und Glyceraldehyd.

Die Abhängigkeit der ROS-Bildung am 1. Infektionstag vom Abstand zum Infektionsherd, die bei den DAB-Bildern in 14.11B gegenüber 14.11C sichtbar wird, mag eine Erklärung für den großen Fehlerbalken in Abb. 14.16 bei SHAM am 1. Tag zu sein. Auch Abb. 14.18B zeigt bei SHAM ein sehr uneinheitliches Verhalten gegenüber dem unvergifteten Blatt. Die Aufhellung in 14.11C steht nur im scheinbaren Widerspruch zu der Abbildung 14.18, denn hier wurden Bereiche mit hoher Fluoreszenz ausgesucht und nicht wie in 14.11 ein größeres Gebiet betrachtet.

Wie im SHAM-Bild in der Abb. 14.11A ist das gesunde Blatt unter Glyceraldehyd (Abb. 14.12A) etwas dunkler als die gesunde, unvergiftete Kontrolle (Abb. 14.10A). Dies scheint im Widerspruch zu den Ergebnissen in Abb. 14.16, 14.18 und 14.19 zu stehen, in denen kein Einfluss, bzw. eher eine Abnahme der ROS-Bildung unter Glyceraldehyd zu finden ist. Dies zeigt, dass der Grundton möglicherweise stark von Beladung und Aufnahmetechnik abhängt und andere Kriterien ernster genommen werden sollen. Solch ein Kriterium ist zum Beispiel, dass in den Flächen zwischen den Leitbündeln keine braunen Verfärbungen unter Glyceraldehyd auftreten. Die mittleren Leitbündel scheinen jedoch tatsächlich etwas mehr ROS entwickelt zu haben als die unvergiftete Kontrolle in Abb. 14.10A.

An den ersten beiden Tagen der Infektion (Abb. 14.12B, D) tritt unter Glyceraldehyd bei den Blattstellen ohne Infektionsherde eine nur schwache Erhöhung der ROS-Bildung auf. Erst am dritten Tag (Abb. 14.12F) wird die Braunfärbung sehr stark. Dieser Befund entspricht dem Verhalten unter Glyceraldehyd in Abb. 14.18 unter Schwachlicht, also vor Beleuchtung mit dem Laser.

#### 14.7.4 Induktion der ROS-Bildung mit Schwachlicht

Um zu untersuchen, ob die Effekte der Abb. 14.17 und 14.18 in den Zeitverläufen der licht-induzierten ROS-Bildung mit abnehmender Lichtintensität verschwinden, wurden analoge Messungen nun mit der Lichtleitfaser (siehe Abschnitt 14.2.3) durchgeführt. Die Faser ergibt nur eine Intensität von  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  auf der Blattunterseite, wo die ROS-Bildung beobachtet wird.

Abbildung 14.19 zeigt die Zeitverläufe der ROS-Bildung für Kontrolle (A) und infizierte Pflanzen ein (B), zwei (C) und drei (D) Tage nach Infektion in Anwesenheit der jeweils angegebenen Gifte.

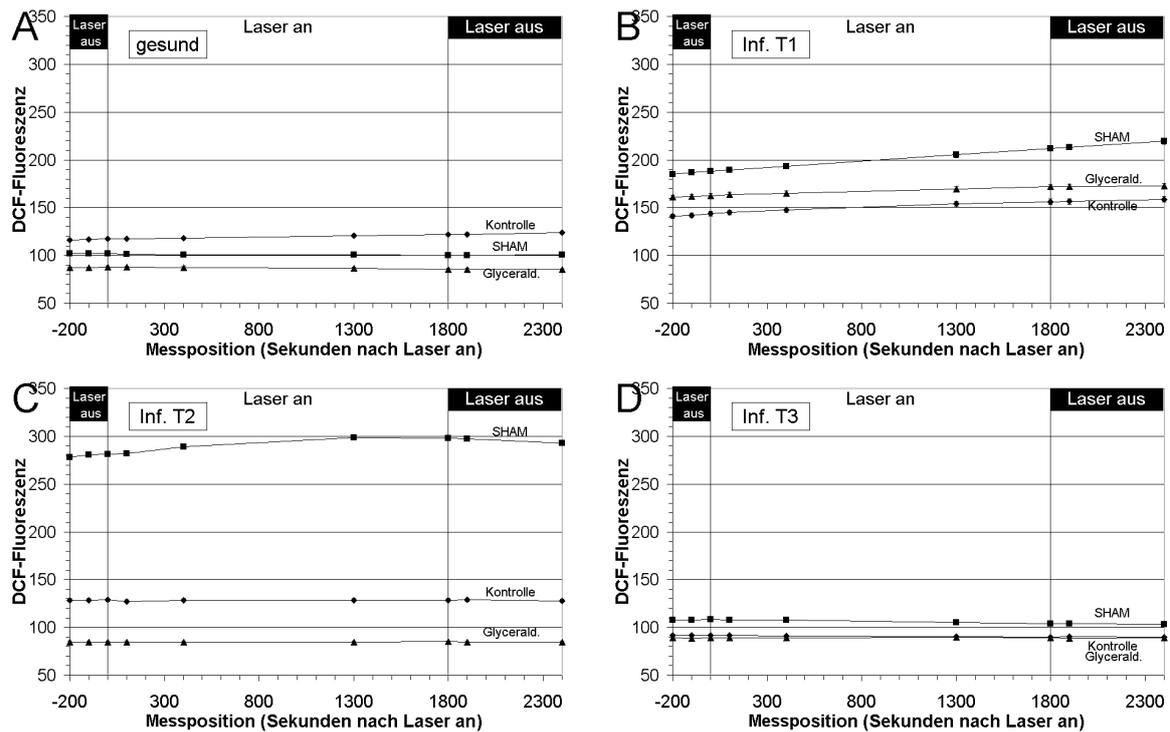
In keiner der Messungen in Abb. 14.19 zeigt sich eine erkennbare Reaktion auf das Licht. Wenn sich überhaupt Veränderungen über die Zeit ergeben, z. B. in Abb. 14.19B und C, so hat sich die Steigung der Kurven durch das Licht nicht verändert. Es zeigt sich damit, dass für die sichtbare ROS-Entwicklung Starklicht erforderlich ist. Die erhöhten SHAM-Werte liegen an der Dunkelatmung.

#### 14.7.5 ROS-Entwicklung in der Dunkelphase

Im vorherigen Abschnitt stand die licht-induzierte ROS-Entwicklung im Vordergrund des Interesses. Doch die Aufzeichnung im Zeitbereich von ca. 1000 s vor Einschalten des Lasers gestattet auch die ROS-Entwicklung im Dunkeln zu beobachten.

#### Auswertung

Dazu wurden aus den Zeitverläufen in den Abbildungen 14.18 und 14.19 die Fluoreszenz-Werte für die Zeitpunkte -500 s vor dem Einschalten des Lasers ( $F_{-500\text{s}}$ ) und 0 s (Einschaltzeitpunkt,  $F_{0\text{s}}$ ) nach Beginn der Messung ermittelt. Hierbei wurden alle oben genannten Kurventypen verwendet, um eine größere Datenbasis zu bekommen. Abbildung 14.20 A und B zeigt die gemittelten Werte für den Zeitpunkt 0 s. Obwohl die Ergebnisse dieser Messungen natürlich nicht von der Intensität des Lichtes zum Zeitpunkt der Messung abhängen können, da nur das sehr schwache Messlicht ( $1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) eingeschaltet war, werden sie getrennt betrachtet, denn sie fanden zu unterschiedlichen Jahreszeiten statt („LL“ im Juni/Juli und „HL“ im September/Oktober).



**Abbildung 14.19:** Zeitverläufe der durch Schwachlicht ( $LL$ ,  $150\text{--}200\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) induzierten ROS-Bildung bei (A) gesunden Weizenblättern und mit *Septoria tritici* vor (B) einem, (C) zwei oder (D) drei Tagen infizierten. Die Linien markieren die Zeitpunkte des Ein- bzw. Ausschaltens des Lasers. Die Mittelwerte entstanden aus 4-19 DCF-Fluoreszenzmessungen pro Datenpunkt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Blätter wurden 3 Stunden vor dem Zeitpunkt 0 über den Transpirationsstrom mit dem Farbstoff und den eingezeichneten Giften (Konzentration: siehe Tabelle 14.2) beladen. Bei 0 s wurde der Laser eingeschaltet und bei 1800 s wieder aus.

Die bereits bei den Gasfluss-Messungen im Abschnitt 10.5 beschriebene Abhängigkeit von der Jahreszeit legt eine solche Trennung nahe.

Neben dem Momentanwert für  $t = 0\ \text{s}$  am Ende der Dunkelphase soll auch die zeitliche Veränderung in der Dunkelphase erfasst werden. Aus den Fluoreszenz-Werten bei  $t = -500\ \text{s}$  und  $t = 0\ \text{s}$  kann ein relativer Anstieg berechnet werden:

$$F_{rel} = \frac{F_{-500s} - F_{0s}}{F_{0s}} \quad (14.2)$$

Abbildung 14.20C und D zeigt die gemittelten relativen DCF-Fluoreszenz-Anstiege und Abb. 14.20E,F die gemittelten Fluoreszenz-Werte ( $y$ -Achse), aufgetragen über den zugehörigen gemittelten  $F_{rel}$ -Werten ( $x$ -Achse). Zwei mit „\*“ bzw. „\*\*“ markierte Balken sind signifikant verschieden ( $p=0.05$ ).

## Ergebnisse

*Fluoreszenz-Werte nach Infektionstagen:* In Abbildung 14.20A ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen infizierten und gesunden Blättern nur am ersten und zweiten Tag nach der Infektion. Bei den Messungen im Juni/Juli sieht man am 1. Tag der Infektion eine allgemeine Stimulation der ROS-Entwicklung, die jedoch nicht sehr ausgeprägt ist. Der stärkste Effekt ergibt sich für SHAM am 2. Tag. Der dritte Tag unterscheidet sich nicht sehr signifikant von der uninfizierten Kontrolle. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p=0.05$ ) bestehen bei den ge-

sunden Blättern zwischen der Kontrolle und Glycerinaldehyd und am Tag 2 nach der Infektion zwischen der Kontrolle und SHAM.

Bei den Messungen im September/Okttober in Abbildung 14.20B ist das Bild nahezu umgekehrt und zeigt damit die starke Abhängigkeit von der Jahreszeit: Bei den gesunden Blättern und am dritten Tag sind deutliche Unterschiede zwischen Kontrolle bzw. Glycerinaldehyd und SHAM (bei den gesunden sogar signifikant,  $p=0.05$ ) erkennbar, am Tag 1 und 2 sind solche kaum vorhanden.

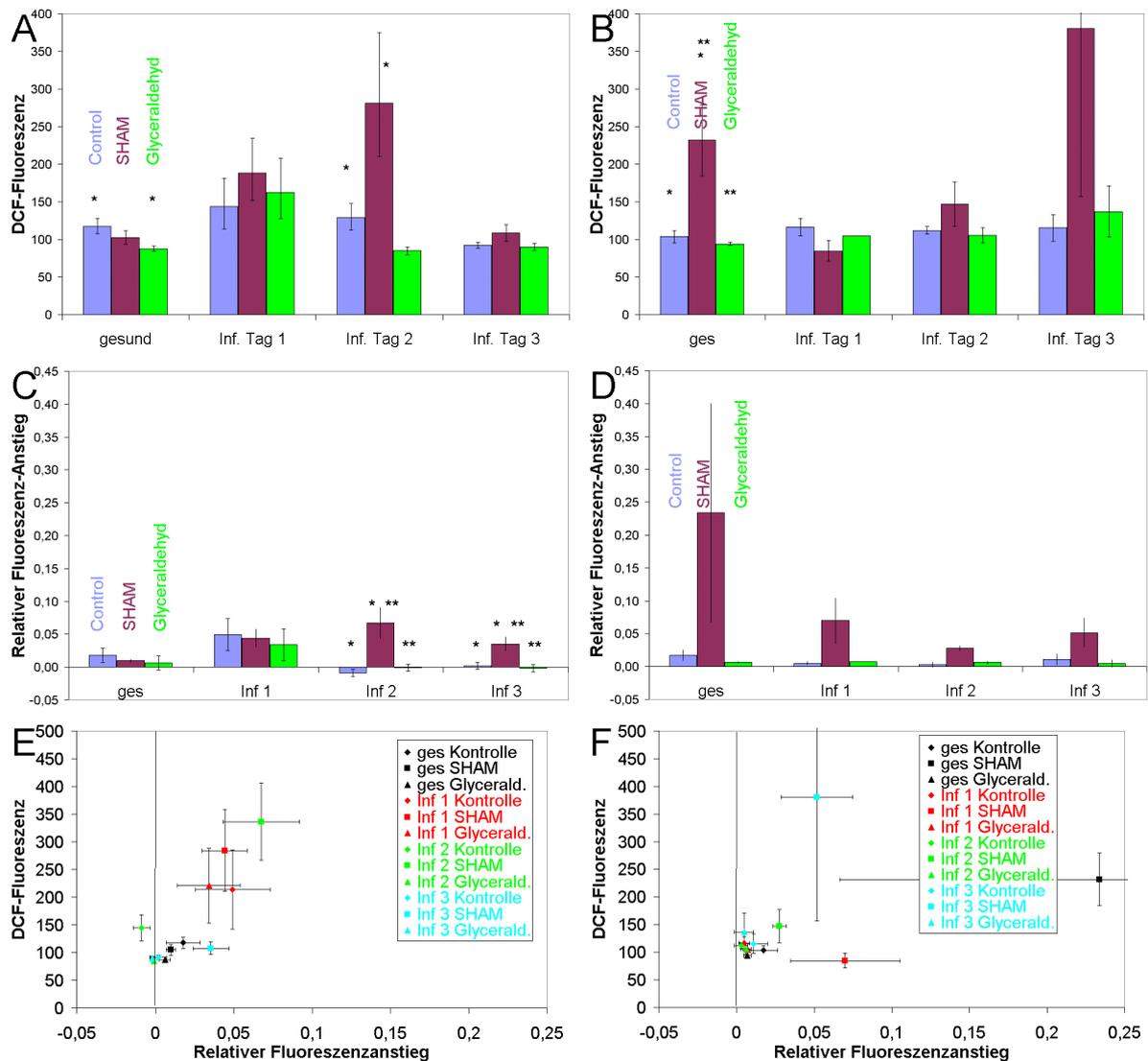
In der Abbildung 14.20C findet sich bei den Anstiegen der gesunden Kontrolle keine Unterschiede in den verschiedenen Giften. Am Tag 1 nach der Infektion ist dies ebenso, allerdings findet hier in den letzten 500 s der Dunkelphase ein kleiner Anstieg im ROS-Level statt. Am Tag 2 und 3 finden sich keine Anstiege mehr bei der Wasser-Kontrolle und auch nicht bei Glycerinaldehyd, dafür steigt aber SHAM signifikant deutlich an. In Abb. 14.20D hingegen findet sich nur bei SHAM ein deutlicher Anstieg, der bei der gesunden Kontrolle sehr stark ist und bei den infizierten Blättern deutlich geringer, wobei am Tag 2 der geringste Anstieg zu finden ist. Im Kapitel 15 und in Hammes et al. (2005) wird dies weiter ausgeführt.

*Fluoreszenz-Werte am Ende der Dunkelphase aufgetragen über der Veränderung im Dunkeln:* In Abbildung 14.20E liegen die meisten Mittelwertspunkte im Bereich um 0% Anstieg herum, auch der Endwert der Fluoreszenz ist hier fast gleich. Bei den wenigen Punkten, wo dieser Wert deutlich höher liegt, ist auch der relative Anstieg im Bereich um 5% und höher. Die deutlichsten Unterschiede ergeben sich für alle Gifte am Tag 1 und generell für die SHAM-Messungen am Tag 1–3. Auch in Abbildung 14.20F sieht die Sache anders aus: Hier „drängen“ sich zwar auch die meisten Punkte bei 0 und ca. 100 zusammen, aber die, welche herausfallen, sind die vier SHAM-Messungen, die sich damit nicht nur durch eine höhere Fluoreszenz, sondern auch noch durch einen wesentlich stärkeren Anstieg auszeichnen.

#### 14.7.6 Vergleich der verschiedenen Lichtbedingungen

Licht-induzierte ROS-Entwicklung ist nur bei starkem Licht (HL) erkennbar, bei wenig Licht bleibt das Niveau (oder der Anstieg) gleich. Dies lässt darauf schließen, dass die Blätter bei LL eine geringe licht-induzierte ROS-Produktion haben oder in der Lage sind, den von den Chloroplasten produzierten ROS-Anteil wegzufangen. Erst bei HL ist die Anregung der ROS-Produktion so massiv, dass die ROS-Bekämpfung den Abbau nicht mehr schafft.

Beim Vergleich der Fluoreszenz-Werte am Ende der Dunkelphase und des Anstiegs in Dunkelheit sollten eigentlich keine Unterscheide zwischen den beiden Messreihen mit LL und HL erkennbar sein, da die Blätter zum Zeitpunkt der Datenerfassung noch kein Licht gesehen haben. Dass sich dennoch das Ergebnismuster fast umdreht (Tag 1 und 2 gegen gesund und Tag 3) kann demnach nur an jahreszeitlichen Unterschieden liegen (wie auch schon in Abschnitt 10.5 gezeigt): Die mit „LL“ bezeichneten Messungen (Abb. 14.19) fanden im Juni/Juli statt und die „HL“-Messungen (Abb. 14.18) im September/Oktober. Die Frage, ob die Ursache dieser Unterschiede von den Pflanzen herrühren oder vom Pilz, der für die Infektion verwendet wurde, lässt sich teilweise aus Abb. 14.20 beantworten: Unterschiede in der SHAM-Empfindlichkeit treten bereits ohne Pilzinfektion auf.



**Abbildung 14.20:** (A,B) Mittelwerte der Fluoreszenzsignale von DCF-DA am Ende der Dunkelphase (Zeitpunkt 0 in der Abbildung 14.18) bei gesunden und mit *Septoria tritici* vor 1–3 Tagen infizierten Weizenblättern; Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. „\*“ bzw. „\*\*“ kennzeichnen signifikant unterschiedliche Mittelwerte ( $p=0.05$ ). Die Blätter wurden 3 Stunden vor dem Zeitpunkt 0 über den Transpirationsstrom mit dem Farbstoff und den angegebenen Giften (Konzentration: siehe Tabelle 14.2) beladen. (C,D) Der relative Anstieg der Fluoreszenz in den letzten 500 s Dunkelphase nach Gleichung 14.2. (E,F) die gleichen Fluoreszenz-Werte wie in A,B, aber aufgetragen über der relativen Fluoreszenz-Änderung in den letzten 500 s der Dunkelphase aus E,F. Die Messungen (A,C,E) sind vom Juni/Juli (LL-Serie, Abb. 14.19) und (B,D,F) vom September/Oktober (HL, Abb. 14.18)



## Kapitel 15

# Hinweis auf eine mögliche Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung

Die Photosynthese in den Chloroplasten und die Atmung in den Mitochondrien (siehe Abschnitt 3.2 bzw. 3.3) können nicht länger als unabhängige Prozesse betrachtet werden (Gardeström, 1996; Igamberdiev et al., 1997b, 1998; Padmasree und Raghavendra, 1999a; Guo et al., 2005).

Unstrittig ist inzwischen die Beteiligung der Mitochondrien bei der Photorespiration, wenn Glycolat in Glycerat umgewandelt wird mit Hilfe der Peroxisomen und Mitochondrien (Heldt, 2003). Auch das Missverhältnis zwischen NADPH- und ATP-Produktion in der Elektronen-Transport-Kette und Verbrauch im Calvin-Zyklus machen einen Export von Redox-Äquivalenten aus dem Chloroplasten nötig (Noctor und Foyer, 1998). Eine große Rolle spielt dabei das Malat-Shuttle (Backhausen et al., 1994; Krömer, 1995; Igamberdiev et al., 1998).

Bisher konnte auf die Existenz dieser Verbindungen nur geschlossen werden aus Versuchen mit Stoffwechsellinhibitoren (Igamberdiev et al., 1997b, 1998; Padmasree und Raghavendra, 1999a; Schinner et al., 2001b), Diskrepanzen in Gasfluss-Experimenten (Guo et al., 2005) oder aus dem Vergleich von Stöchiometrien (Noctor und Foyer, 1998). In diesem Kapitel wird eine Beobachtung gezeigt, die sich für die Online-Beobachtung des Exportes von Redox-Äquivalenten aus dem Chloroplasten eignen könnte. In Gegenwart von SHAM (Inhibitor der Alternativen Oxidase in den Mitochondrien) zeigt DCF (siehe Kapitel 14) als Indikator von ROS einen Licht-induzierten Abfall der Fluoreszenz. Dies wird diskutiert im Hinblick auf Mechanismen, die von dem NADPH, das aus dem Chloroplasten exportiert wird, beeinflusst werden können (Hammes et al., 2005).

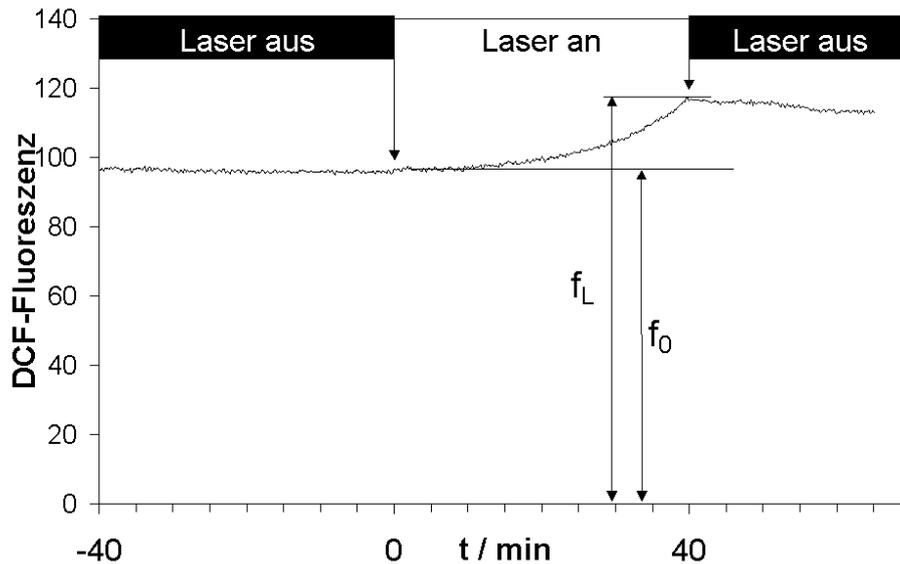
### 15.1 Messaufbau und Ablauf

Die Messungen in diesem Kapitel fanden unter den selben Bedingungen statt wie die im Abschnitt 14.7: „Licht-induzierte ROS-Entwicklung“, weshalb diese hier nur kurz wiederholt werden:

- Selbst angezogene Weizenpflanzen auf Vermiculit mit einem Alter von 14 Tagen.
- Beladung der Blätter mit  $60\mu\text{M}$  DCF-DA in SM und einige zusätzlich mit  $20\text{mM}$  SHAM über zwei Stunden im Dunkeln.
- Einbau in das Fluoreszenz-Mikroskop (beschrieben im Abschnitt 14.2).
- Aktinisches Licht: Laser mit Umlenkspiegel (Messungen September–Oktober, High-Light-Bedingungen,  $670\text{--}890\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).
- Messablauf wie im Abschnitt 14.7 beschrieben: 50 min Dunkelheit, 40 min Laser an, 20 min Dunkelheit.

## 15.2 Ergebnisse der Messungen an uninfizierten Blättern

### 15.2.1 Kontrolle



**Abbildung 15.1:** DCF-Fluoreszenz als ROS-Nachweis in Reaktion auf Licht (Laser an bei  $t = 0$  s) bei einem gesunden Kontrollblatt, das mit DCF-DA beladen wurde.

Abbildung 15.1 zeigt einen typischen Zeitverlauf der DCF-Fluoreszenz (9 Wiederholungen), nachdem ein nicht infiziertes Weizenblatt mit DCF-DA beladen und dem beschriebenen Messprotokoll unterworfen wurde.

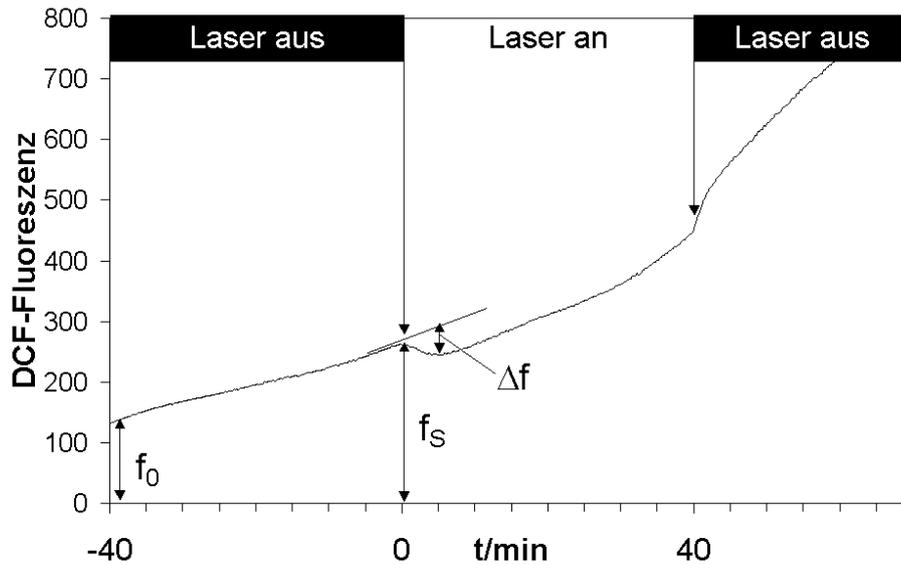
Das Fluoreszenz-Level bleibt konstant in der Dunkelphase mit dem nur sehr schwachen Messlicht (siehe Abschnitt 14.2.3), das Blatt ist also in der Lage, entstehendes ROS zu bekämpfen. Nach Einschalten des Lasers ergibt sich ein Anstieg in der Fluoreszenz und damit ROS-Produktion. Der Ursprung ist hier nicht genau untersucht worden, aber es kann angenommen werden, dass die Chloroplasten die Quelle sind wie es auch in der Abbildung 14.6 zu sehen ist und bei *Arabidopsis thaliana* unter ähnlichen Bedingungen berichtet wird (Hoffmann et al., 2005).

### 15.2.2 SHAM

In bisherigen Versuchen wurde SHAM verwendet, um die Kopplung zwischen chloroplastischem und mitochondrialem Elektronenfluss zu untersuchen (Schinner et al., 2001b; Guo et al., 2005) wie auch in anderen Arbeitsgruppen (Padmasree und Raghavendra, 1999a; Igamberdiev et al., 1998). Abb. 15.2 zeigt eine neue Rolle des Einsatzes von SHAM für Untersuchungen in diesem Bereich.

SHAM hat dort einen starken Einfluss auf das zeitliche Verhalten der DCF-Fluoreszenz. Im Gegensatz zu der Messung in Abb. 15.1 steigt die DCF-Fluoreszenz hier bereits in der Dunkelheit, d. h. unter dem sehr schwachen Messlicht, deutlich an.

Da die Photosynthese unter diesem schwachen Licht kaum aktiv ist, muss angenommen werden, dass hier die Quelle für ROS die Mitochondrien sind. SHAM inhibiert die Alternative Oxidase (AOX), deren Aufgabe es ist, überschüssige Redox-Äquivalente in der mitochondrialen ETC zu verbrennen. Die Blockierung der AOX durch SHAM führt deshalb zur ROS-Produktion bereits im Dunkeln. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass die Zunahme der DCF-Fluoreszenz in der Dunkelphase in Abbildung 15.2 ungefähr fünf mal stärker ist als der lichtinduzierte Zuwachs am Ende der Beleuchtungsperiode in Abb. 15.1.



**Abbildung 15.2:** DCF-Fluoreszenz als ROS-Nachweis in Reaktion auf Licht (Laser an bei  $t = 0$  s) bei einem gesunden Blatt, das mit SHAM und DCF-DA beladen wurde.

Die relative Fluoreszenzzunahme errechnet sich mit Hilfe der in den Abbildungen 15.1 und 15.2 eingezeichneten Größen zu:

$$F_{\text{rel,SHAM}} = \frac{f_S - f_0}{f_0} \quad (15.1)$$

$$F_{\text{rel,Kontrolle}} = \frac{f_L - f_0}{f_0} \quad (15.2)$$

Dabei sind  $f_S$  und  $f_0$  in Abb. 15.2 definiert und  $f_L$  und  $f_0$  in Abb. 15.1. Für die mit SHAM vergifteten Blätter ergibt sich dann ein Mittelwert aus vier Experimenten:  $F_{\text{rel,SHAM}} = 112\% \pm 45\%$ . Bei den Kontrollblättern hingegen ist der Mittelwert der relativen Fluoreszenzzunahme während der Beleuchtungsphase:  $F_{\text{rel,Kontrolle}} = 22\% \pm 4\%$ .

Da SHAM die Alternative Oxidase (AOX) inhibiert (siehe Abschnitt 4.3), ist die ROS-Zunahme in der Dunkelheit in Abbildung 15.2 ein direkter Nachweis für die Wichtigkeit der AOX zur Verhinderung der ROS-Produktion (Purvis, 1997; Hoefnagel et al., 1998; Maxwell et al., 1999; Affourtit et al., 2001; Deng et al., 2002).

Das spannende Ergebnis ist aber die Abnahme der DCF-Fluoreszenz direkt nach dem Einschalten des aktinischen Lichtes in Abbildung 15.2. Dieser Effekt ist reversibel nach Ausschalten des Lichtes, was bei 80 min in Abb. 15.2 geschieht. Der Ursprung des Anstiegs in der Kurve während der Beleuchtung und nach „Licht aus“ ist hier nicht Gegenstand der Untersuchung. Es mag von der Beschleunigung der SHAM-induzierten ROS-Produktion herrühren, von der Erschöpfung der ROS-fangenden Enzyme oder von einem Licht-Effekt wie in Abbildung 15.1. Die Untersuchungen hier beschränken sich auf den Licht-induzierten Abfall der DCF-Fluoreszenz zu Beginn.

Dieser Effekt kann nicht von einer licht-stimulierten ROS-Produktion in den Chloroplasten herrühren, weil diese zu einer Zunahme des ROS-Levels und damit der Fluoreszenz führen würde.

Die relative Fluoreszenz-Abnahme nach „Licht an“ ergibt sich mit den Größen aus der Abbildung 15.2 zu:

$$\Delta F_{\text{rel,SHAM}} = \frac{\Delta f}{f_0} = 20\% \pm 11\% \quad (15.3)$$

Diese Abnahme steht in Verbindung mit der ROS-Produktion, welche durch die Inhibierung durch SHAM verursacht wird. Bei keinem Experiment, bei dem dieser Licht-induzierte Abfall gefunden wurde, zeigte sich ein konstantes ROS-Niveau im Dunkeln wie in Abb. 15.1, sondern immer ein Anstieg. Daraus kann geschlossen werden, dass diese Abnahme des ROS-Levels nach Einschalten des Lichtes mit der SHAM-induzierten Produktion von ROS in den Mitochondrien zusammenhängt. Für die DCF-Fluoreszenz-Abnahme gibt es drei mögliche Erklärungen:

1. Die DCF-Fluoreszenz wird gequencht. Es gibt einige Hinweise darauf, dass NADH als Quencher agieren kann (Batandier et al., 2002).
2. Die Licht-induzierte Versorgung mit NAD(P)H kann die ROS-fangenden Systeme stimulieren (Shigeoka et al., 2002), was zu einer Erniedrigung des ROS-Levels führen würde. NAD(P)H ist nötig für die Reduktion von Monodehydroascorbat und von GSSG im Cytosol, in den Peroxisomen und Chloroplasten. Der Ort dieser Reaktionen ist vermutlich nicht wichtig, da  $H_2O_2$ , welches in einem Kompartiment gebildet wird (z. B. in den Mitochondrien durch die Wirkung von SHAM) problemlos durch die Zellen diffundieren und deshalb überall eingefangen werden kann (Neill et al., 2002b).
3. Die Produktion von ROS wird inhibiert. In diesem Fall sind mehrere Möglichkeiten zu erörtern: Einerseits ist ein Signalweg zwischen den Chloroplasten und den Mitochondrien denkbar, allerdings ist nichts bekannt über mögliche Signalstoffe. Andererseits ist möglicherweise auch hier NADH involviert. So haben einige Untersuchungen gezeigt, dass eine Überreduktion des Quinon und eine Hyperpolarization des Membranpotentials die Reoxidation des Komplex I in tierischen Zellen (Turrens, 2003) und in Pflanzenzellen (Casolo et al., 2000) behindert. Dies erhöht deutlich die ROS-Produktion im Eisen-Schwefel-Cluster N2 (Genova et al., 2001) oder N1-a (Kushnareva et al., 2002).

Dabei ist es nicht nur die Störung der Reoxidation des Ubiquinol (Kushnareva et al., 2002) was Probleme macht: Einige Autoren (Braidot et al., 1999; Gredilla et al., 2001; Batandier et al., 2004) haben festgestellt, dass das Füttern des Komplex II mit Succinat aus dem TCA-Zyklus zu einer stärkeren ROS-Erzeugung führt als die Anlieferung von NADH zum Komplex I. Diese Unterschiede in der ROS-Bildung von Komplex I und Komplex II bietet eine mögliche Erklärung für die Reduktion der ROS-Produktion in der Abbildung 15.2: Hohe NADH-Level in den Mitochondrien (Igamberdiev und Gardeström, 2003) führen zu einer Runterregulierung des TCA-Zyklus. Dies würde eine Verschiebung der Redox-Erzeugung vom gefährlichen Komplex II zu dem weniger gefährlichen Komplex I bedeuten.

Wenn die Senkung der ROS-Produktion zu dem lichtinduzierten Abfall in Abb. 15.2 führen soll, dann muss allerdings angenommen werden, dass DCF ROS nicht als Integrator anzeigt, d. h. es muss Abbaureaktionen für oxidiertes DCF geben. Das kann z. B. Zerfall oder Export in die Vakuolen sein, wo ein niedriger pH-Wert keine Fluoreszenz zulässt. Diese Frage ist nicht geklärt. Es gibt allerdings viele Aufzeichnungen, in denen eine DCF-Fluoreszenz-Abnahme beobachtet wurde, ein Hinweis auf Abbaureaktionen.

Die drei möglichen Szenarien haben trotz ihrer Verscheidenheit etwas gemeinsam: Export des NADH führt (direkt oder indirekt) zu einer Abnahme der DCF-Fluoreszenz im Licht (15.2). Wie oben gesagt kann NADH aus den Chloroplasten über mehrere Mechanismen geliefert werden, zum Beispiel aus der Serin-Glycin-Umwandlung in der Photorespiration, oder aus dem Malat-Ventil (Backhausen et al., 1994; Krömer, 1995; Gardeström, 1996; Hoefnagel et al., 1998; Igamberdiev et al., 1997b, 1998, 2001; Noctor und Foyer, 1998).

### 15.2.3 Schlussfolgerung

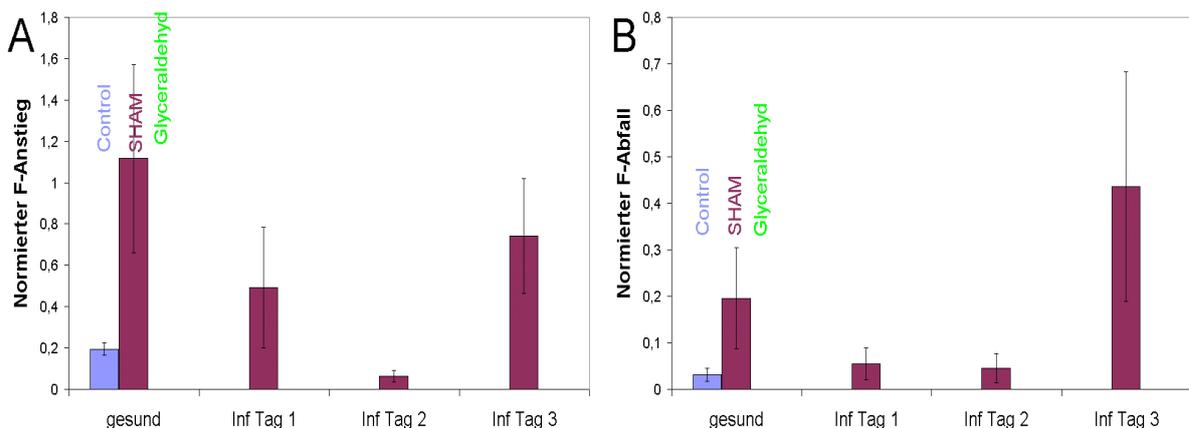
Da SHAM die Möglichkeiten der Mitochondrien freie Radikale zu vermindern durch die Ausschaltung der AOX beschränkt, werden Störungen in der ROS-Bildung in Experimenten viel deutlicher erkennbar. Obgleich die Identifikation des Ursprungs der Abnahme der DCF-Fluoreszenz in Abb. 15.2 weitere Nachforschungen benötigt, kann festgestellt werden, dass SHAM die Möglichkeit eröffnet für einen Zugang zu einer zeitaufgelösten Messung des Exports von Redox-Energie aus den Chloroplasten.

## 15.3 Ergebnisse der Messungen an infizierten Blättern

Es wurden nun nach dem Messprotokoll des vorigen Abschnitts (15.2) Messungen an mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern vorgenommen.

### 15.3.1 Messungen mit Anstieg im Dunkeln (Typ Abb. 15.2)

Die schon im Abschnitt 15.2.2 beschriebenen und nach den Formeln in Gleichung 15.1 bzw. 15.3 berechneten Größen „Fluoreszenz-Anstieg im Dunkeln“  $F_{\text{rel,SHAM}}$  und „Fluoreszenz-Abnahme nach Licht an“  $\Delta F_{\text{rel,SHAM}}$  als Reaktion auf den Laser wurden nun auch für infizierte Blätter gemessen. Sie finden sich gemittelt in der Abbildung 15.3. In die Grafiken sind nur solche Werte eingeflossen, die von „passenden“ Messungen stammen, das heißt solchen, bei denen in der Dunkelheit bereits ein Anstieg stattfand wie in Abb. 15.2.



**Abbildung 15.3:** Mittelwerte der relativen DCF-Fluoreszenzänderungen bei gesunden und mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern: (A) Anstieg in der Dunkelphase ( $F_{\text{rel,SHAM}}$ ) gemäß Gleichung 15.1. (B) Abfall der DCF-Fluoreszenz nach dem Einschalten des Lichtes ( $\Delta F_{\text{rel,SHAM}}$ ) gemäß Gleichung 15.3. Die Blätter wurden wie im Text mit DCF-DA und den angegebenen Giften beladen und an denen auf der x-Achse angegebenen Tagen nach der Infektion gemessen. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an.

Der Anstieg im Dunkeln (Abb. 15.3A) ist bei den gesunden Blättern, wie schon im Abschnitt 15.2 gezeigt, bei SHAM um den Faktor 5 höher als bei der unvergifteten Kontrolle, bei Glyceraldehyd trat überhaupt kein nennenswerter Anstieg auf. Der kleine Anstieg in den unvergifteten Blättern in Abb. 15.3 zeigt an, dass die ROS-Produktion im Dunkeln, also durch die Atmung, nicht immer vollständig unterbunden werden kann. Nur bei Ausfall der AOX unter SHAM ist die Produktion sehr viel größer. Bei den mit *Septoria tritici* infizierten Blättern findet sich ein Anstieg im Dunkeln nur bei einer Vergiftung mit SHAM, wobei der Wert am ersten und zweiten Tag deutlich geringer ist als bei den gesunden Blättern (40 bzw. 5%), und steigt erst am dritten Tag nach Infektion wieder an, ohne aber den Wert der uninfizierten Blätter wieder zu erreichen.

Die Stärke des Abfalls der Kurve beim Einschalten des Lichtes (Abb. 15.3B) verhält sich bei den gesunden Blättern wie oben bereits beschrieben: Mit SHAM findet sich ein ungefähr siebenfacher Abfall im Vergleich zu Kontrolle. Bei Vergiftung mit Glycerinaldehyd tritt dies gar nicht auf, auch nicht bei infizierten Blättern. Am ersten und zweiten Tag nach der *Septoria-tritici*-Infektion ist der Abfall bei SHAM viel geringer als bei den gesunden, bei der Kontrolle tritt er gar nicht auf. Am Tag drei hingegen ist der SHAM-Wert mehr als doppelt so groß wie bei den gesunden Blättern. Der oben diskutierte Mechanismus zur Verringerung der DCF-Fluoreszenz nach Einschalten des Lichtes, dass NADH aus den Chloroplasten dafür verantwortlich ist, führt hier zu folgenden Vermutungen:

- Die mitochondriale Aktivität ist in infizierten Blättern herabgesetzt (15.3A).
- Der Export (15.3B) trifft auf eine schwache mitochondriale Aktivität oder ist selbst stark heruntergefahren.

Ein abgesenkter Export wird durch den Befund in Abb. 15.4 unterstützt, da dort die Empfindlichkeit gegen Glycerinaldehyd steigt. Am dritten Tag hingegen ist der Export sehr viel stärker.

### 15.3.2 Messungen ohne Anstieg im Dunkeln (Typ Abb. 15.1)

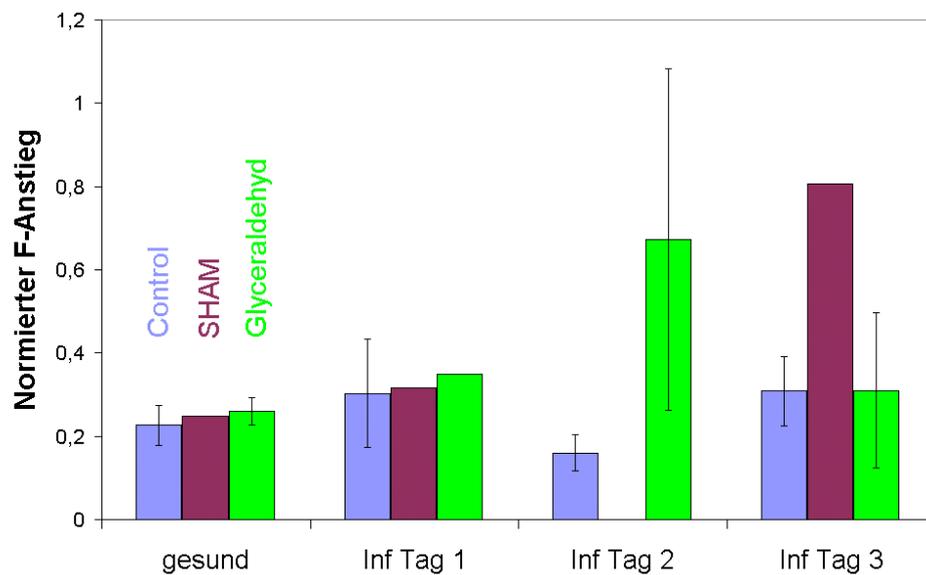
Der Anstieg der ROS-Entwicklung  $F_{\text{rel,Kontrolle}}$  nach Einschalten des Lichtes wurde nach Gleichung 15.2 berechnet. In die in Abb. 15.4 gezeigten Mittelwerte gingen nur solche Messungen ein, bei denen im Dunkeln keinen Anstieg zu sehen war (wie in Abb. 15.1).

Es zeigt sich (Abb. 15.4) bei den gesunden Blättern ein deutlich geringerer Zuwachs als bei dem Dunkelanstieg unter SHAM (Abb. 15.3A), wie ebenfalls schon in Abschnitt 15.2 gezeigt. Dieser ist auch am ersten Tag nach Infektion nicht viel größer, und zwischen den einzelnen Giften und der Kontrolle treten keine nennenswerten Unterschiede auf. Am Tag 2 hingegen ist der Anstieg bei der Kontrolle deutlich gesunken und bei Glycerinaldehyd stark gestiegen. Letzteres deutet darauf hin, dass hier verstärkt ROS in der ETC der Chloroplasten gebildet wird, weil durch den gehemmten Calvin-Zyklus die Akzeptoren fehlen und aufgrund der Infektion wahrscheinlich zu wenig Export stattfindet. Für SHAM fanden sich am Tag 2 keine Messungen für den Parameter „Reaktion auf Licht“, da die Messungen alle den Dunkelanstieg (Typ Abb. 15.2) zeigten. Am dritten Tag hat sich die Fluoreszenz-Zunahme sowohl bei der Kontrolle als auch bei Glycerinaldehyd wieder fast auf den gesund-Wert eingestellt, aber SHAM ist deutlich erhöht, so dass hier wieder ein möglicherweise verstärkter Export in die Mitochondrien passiert, der bei Glycerinaldehyd-Vergiftung die Redox-Equivalente aufnimmt, der aber durch SHAM und die dann fehlende AOX deutlich mehr ROS erzeugt.

## 15.4 Zusammenfassung

Die Ergebnisse in diesem Kapitel lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. SHAM steigert die ROS-Bildung im Dunkeln.
2. Infizierte Pflanzen haben scheinbar weniger mitochondriale Aktivität, da die Vergiftung der AOX sich nicht so stark auswirkt.
3. NAD(P)H aus den Chloroplasten kann durch drei möglichen Mechanismen die ROS-anzeigende Fluoreszenz senken.
4. Am zweiten Infektionstag scheint der NAD(P)H-Export aus den Chloroplasten geschwächt zu sein.



**Abbildung 15.4:** Mittelwerte der relativen DCF-Fluoreszenzänderungen gemäß Gleichung 15.2 bei gesunden und mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern. Anstieg als Reaktion auf das aktin. Licht ( $F_{\text{rel, Kontrolle}}$ ). Die Blätter wurden wie im Text mit DCF-DA und den angegebenen Giften beladen und an denen auf der x-Achse angegebenen Tagen nach der Infektion gemessen. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an.



# Kapitel 16

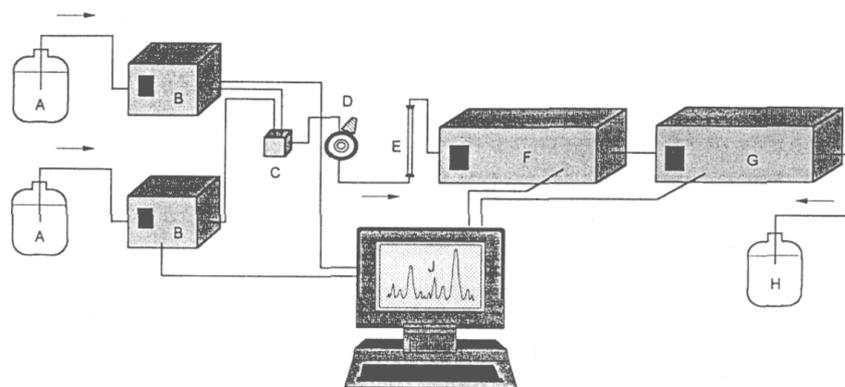
## Zeaxanthin und HPLC

Im Abschnitt 10.2.2 (S. 94) wurden mit Hilfe der Absorption bei 505 nm die Veränderungen im Zeaxanthin-Gehalt (siehe Abschnitt 3.2.6, S. 16) bestimmt. Zur Kontrolle des 505-Absorptions-Zeaxanthin-Signals kommt in diesem Kapitel die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) zum Einsatz. Die Versuche wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. W. Bilger am Institut für Botanik der CAU in Kiel an dessen HPLC-Anlage durchgeführt.

### 16.1 Messverfahren und Aufbau

#### 16.1.1 HPLC-Messung

Die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) dient zur Trennung von Stoffgemischen. Das Prinzip, ähnlich wie bei der klassischen Flüssigkeitschromatographie, ist das folgende: Die zu untersuchende Flüssigkeit (in diesem Fall die gelösten Photosynthesepigmente) werden mit einem Laufmittel (hier Aceton) gemischt und unter hohem Druck durch eine Trennsäule geschickt (Prinzipieller Aufbau in Abbildung 16.1). Diese ist mit einem Material gefüllt, an welches die zu trennenden Stoffe unterschiedlich stark binden. Auf diese Weise benötigen sie eine unterschiedliche Zeit zum Durchqueren der Säule. Dahinter ist ein Detektor angebracht, der fluoro- oder photometrisch die Passage der jeweiligen Stoffe nachweist, wobei aus der Signalstärke dann auf die jeweilige Stoffmenge geschlossen werden kann. Die Zuordnung der sich dabei ergebenden Peaks zu dem zugehörigen Stoff erfolgt über die unterschiedlichen Laufzeiten durch die Säule (die sog. Retentionszeiten). Sind diese aus Messungen mit Vergleichsproben bekannt, so erlaubt ein Chromatogramm, wie in Abbildung 16.3 gezeigt, die Peak- und damit Stoffbestimmung.



**Abbildung 16.1:** Aufbau einer HPLC-Anlage. A: Laufmittel, B: Pumpe, C: Mischkammer, D: Injektions-Ventil, kann durch einen automatischen Probengeber (Autosampler) ersetzt werden, E: Trennsäule, F: Photometer, G: Fluorometer, H: gebrauchte Laufmittel, J: Computer zur Pumpensteuerung und Datenaufnahme.

Die verwendete Anlage stammte von der Firma *Agilent Technologies (Agilent 1100 Series)*. Bei der Trennsäule handelte es sich um den Typ „Hypersil ODS ( $5\mu\text{m}$ ) 4,6x250 mm“ von derselben Firma. Als *Guard Column* (dies ist eine Säule ähnlich der Trennsäule, die dieser vorgeschaltet ist, um Verunreinigungen fernzuhalten) diente eine „OB242284 Hypersil ODS ( $5\mu\text{m}$ ) 4x4 mm“ von Agilent Technologies.

### 16.1.2 Kombinationsmessungen mit Absorption bei 505 nm

Um kontrollieren zu können, inwieweit die Änderungen in der Absorption bei 505 nm auch wirklich von den Änderungen des Xanthophyll-Zyklus bzw. vom Zeaxanthin-Pool herrühren, muss die flüssigkeits-chromatographische Pigmentbestimmung jeweils am selben Blatt erfolgen wie die Absorptionsmessungen.

Die Messung der Veränderungen bei 505 nm erfolgte in Transmission, deshalb wird im Folgenden immer die Bezeichnung „ $T_{505}$ -Signal“ verwendet.

Für die 505-nm-Messung kam die optische Strecke in der Anlage zum Einsatz, die bereits bei den Gasfluss-Messungen (siehe Abschnitt 4.5.2, S. 42) benutzt wurde. Sie ermöglichte das Spülen mit einem Gas der Zusammensetzung 300 ppm  $\text{CO}_2$ , 2%  $\text{O}_2$ , Rest  $\text{N}_2$ , Gesamtfluss: 210 ml/min. Das  $T_{505}$ -Signal wurde nach folgendem Protokoll gemessen, wobei die ersten 10 Minuten der Dunkeladaption dienten:

Zeit	0-10 min	10-15 min	15-25 min
Messung	aus	an .....	an
FC-Messlicht	aus	an .....	an
Aktin.Licht	aus	aus	an (LL oder HL)

Für die Zeaxanthin-Bestimmung mittels  $T_{505}$ -Signals wurde die Differenz dieses Signales auf einen Lichtsprung gemessen. Für die Vergleichbarkeit der Daten musste die Messung mittels HPLC auch eine Differenz zwischen beleuchtetem und unbeleuchtetem Blatt liefern. Die Streuung der Ergebnisse ist im allgemeinen größer, wenn diese beiden Messungen an getrennten Blättern durchgeführt werden. Um dies zu vermeiden, wurden die Blätter in der Gasfluss-Anlage auf der halben Fläche mit einer schwarzen Pappe abgedeckt. Dadurch befanden sich auf einem kleinen Bereich nebeneinander die verdunkelte Kontrollfläche und die helle Fläche, in der sich Zeaxanthin bilden konnte und von der auch das  $T_{505}$ -Signal stammte.

Direkt nach der Messung und der Beleuchtung wurde das Blatt aus der Anlage entfernt, um innerhalb von ca. 20 s (damit sich die Xanthophyll-Gehalte nicht verändern) aus der dunklen und hellen Fläche jeweils ein Blattstück mit einem Durchmesser von 13 mm auszuschneiden, diese in Eppendorf-Tubes zu füllen und in flüssigem Stickstoff einzufrieren. Die Lagerung der Proben in diesen Gefäßen erfolgte dann bis zur Extraktion bei  $-80^\circ\text{C}$ .

## 16.2 Probenextraktion

Für die Zeaxanthin-Bestimmung mittels HPLC war es nötig, die Photosynthesepigmente aus den gefrorenen Blattstücken zu extrahieren. Damit sich dabei keine Veränderungen am Zeaxanthingehalt ergaben, musste dieser Vorgang bei wenig Licht und mit permanenter Probenkühlung stattfinden.

Ablauf der Extraktion:

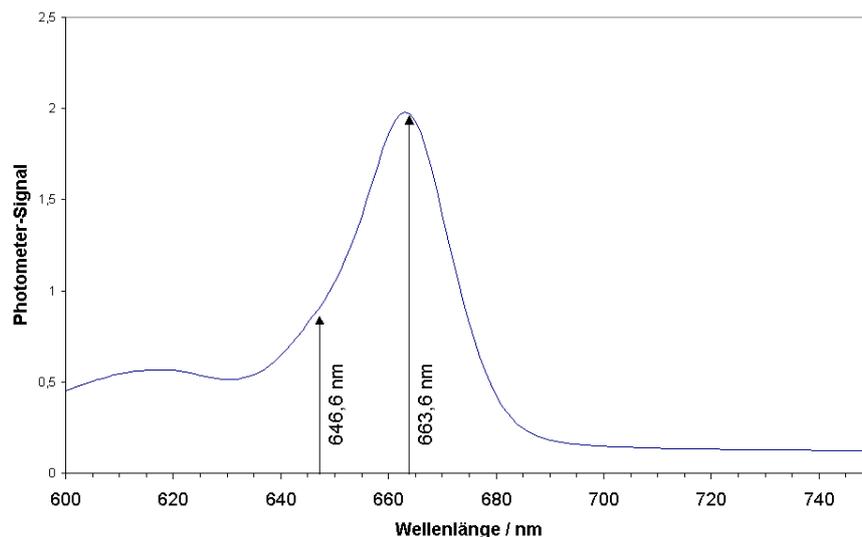
- Der Inhalt des Probenröhrchens, zwischenzeitlich wieder in flüssigem  $\text{N}_2$  gelagert, wird zusammen mit einer Spatelspitze Quarzsand und etwas  $\text{MgHCO}_3$  (zum Abpuffern von Säuren in der Vakuole, die die Carotinoide und Chlorophylle schädigen können) in einen mit flüssigem  $\text{N}_2$  gekühlten Mörser gegeben und zerbrochen.
- Unter Zugabe von 0,5 ml 85% Aceton wird das Blattstück zermörsert und in gekühlte Zentrifugenröhrchen überführt.

- Der Mörser wird erneut mit 85% Aceton gespült und dann mit 100% Aceton (Beta-Carotin löst sich in 85%igem Aceton schwer).
- Der Extrakt wird bei 6000 U/min und 5°C für 5 min zentrifugiert und dann der Überstand dekantiert.
- Das Pellet wird erneut mit 200µl 100% Aceton aufgerührt, erneut zentrifugiert, und der Überstand zu dem anderen gegeben.
- Die Flüssigkeit wird gefiltert und bis zur Messung in der HPLC-Anlage kühl gelagert.

## 16.3 Auswertung

### 16.3.1 Spektralphotometrische Bestimmung der Chlorophyll-Gehalte

Zur Überprüfung der Kalibrierfaktoren der HPLC-Messung wurden die Chlorophyll-Gehalte auch mittels Spektrophotometer bestimmt. Hierzu wurde von einem Teil der extrahierten Pigment-Proben ein Absorptionsspektrum im Bereich von  $\lambda = 600 \dots 750$  nm aufgenommen. Ein solches Spektrum zeigt die Abbildung 16.2.



**Abbildung 16.2:** *Spektrum einer Probe von extrahierten Photosynthesepigmenten, gemessen mit einem Photospektrometer. Die Messwerte an den beiden eingezeichneten Wellenlängen, erlauben es, mit Hilfe der Gleichungen 16.1 und 16.2 die Chlorophyll-a- und -b-Gehalte der Probe zu bestimmen.*

Die Bestimmung der Chlorophyll-Gehalte geschieht nun nach Porra et al. (1989), indem an den beiden in Abbildung 16.2 angegebenen Wellenlängen die Messwerte bestimmt und in die folgenden Formeln eingesetzt werden:

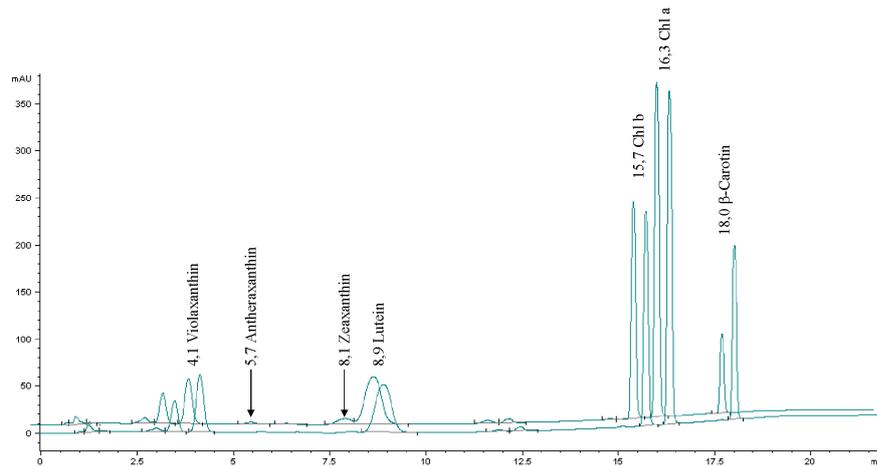
$$\text{Chl}_a[\text{nmol/ml}] = 13,71A^{663,6} - 2,85A^{646,6} \quad (16.1)$$

$$\text{Chl}_b[\text{nmol/ml}] = 22,39A^{646,6} - 5,42A^{663,6} \quad (16.2)$$

Dabei sind  $A^{646,6}$  und  $A^{663,6}$  die Absorptionswerte für  $\lambda = 646,6$  nm bzw.  $\lambda = 663,6$  nm, von denen vorher der Wert für  $\lambda = 750$  nm als Nullwert abgezogen wurde.

### 16.3.2 Bestimmung der Xanthophyll-Gehalte aus den Chromatogrammen der HPLC

Die nach dem im Abschnitt 16.1.1 beschriebenen Messverfahren erhaltenen Chromatogramme (ein Beispiel in Abbildung 16.3) wurden ausgewertet, indem für die einzelnen Peaks die Fläche unter der Kurve bestimmt wurde. In den meisten Fällen wurde dies von der Software automatisch erledigt, bei sehr flachen Kurven oder teilweisem Zusammenfall mit einem anderen Peak konnte die Software die Grenzen zwischen einzelnen Peaks nicht finden. In diesen Fällen wurden mit Hilfe der Software Trennlinien eingefügt, so dass dann die korrekte Fläche berechnet werden konnte.



**Abbildung 16.3:** Chromatogramme zweier HPLC-Messungen von uninferzierten Weizenblättern ohne Licht (untere Kurve) und nach High-Light (Obere Kurve). Zur besseren Übersicht ist die HL-Kurve nach oben und nach links verschoben. Die Zahlen kennzeichnen die Retentionszeiten (in min). Darüber zu lesen sind die zu diesen Zeiten und damit zu den Peaks gehörigen Substanzen. Deutlich erkennbar ist der Zeaxanthin-Peak in der oberen Kurve, der in der Dunkel-Kurve fehlt.

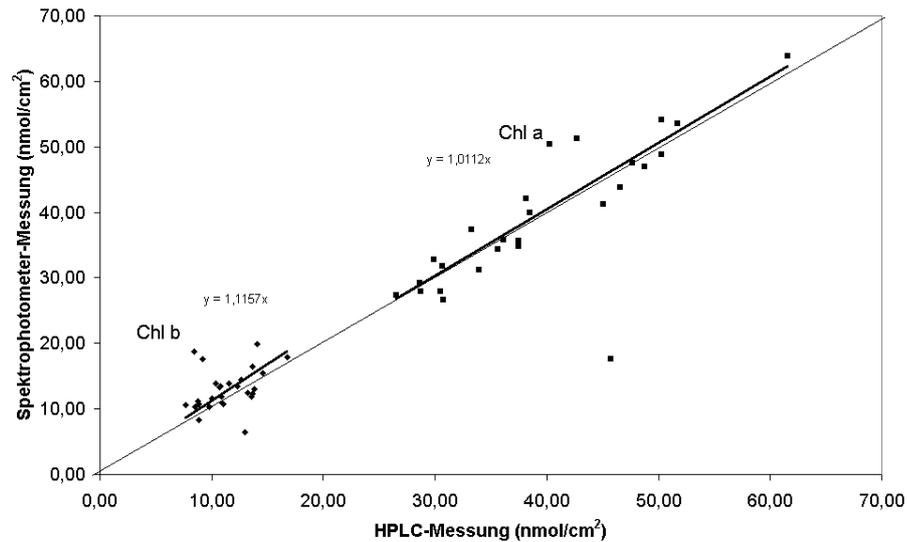
Für jedes Pigment konnte nun zusammen mit den passenden Kalibrierfaktoren, welche bereits in der Arbeitsgruppe Bilger für den verwendeten HPLC-Aufbau vorlagen, durch Multiplikation mit der zugehörigen Peak-Fläche (die zur passenden Retentionszeit am Detektor vorbei kam) der Gehalt an dem jeweiligen Pigment errechnet werden. Dies ergibt die absoluten Gehalte in dem jeweiligen Blattstück.

Die Pigment-Gehalte des Xanthophyll-Zyklus wurden in Relation zum Gesamtchlorophyll-Gehalt gesetzt:

$$\text{Pigment pro Chlorophyll} = \text{Pigment} / (\text{Chl}_a + \text{Chl}_b) \quad (16.3)$$

Da in dieser Relation die Korrektheit der Chlorophyll-Gehalte besonders wichtig ist, wurden die mit der HPLC ermittelten  $\text{Chl}_a$ - und  $\text{Chl}_b$ -Gehalte (und damit auch die passenden Kalibrierfaktoren) mit denen aus den Spektrophotometermessungen (siehe Abschnitt 16.3.1) verglichen, wie in Abbildung 16.4 dargestellt.

Die Punkte liegen im Rahmen der Messungenauigkeit auf der Winkelhalbierenden, somit sind die verwendeten Kalibrierfaktoren in Ordnung und damit auch die Messergebnisse.



**Abbildung 16.4:** Vergleich der Messungen der  $Chl_a$  (Quadrate)- und  $Chl_b$  (Rauten)-Gehalte mit HPLC ( $x$ -Achse) und Spektrophotometer ( $y$ -Achse). Im Rahmen der Messungenauigkeit liegen die Punkte auf der Winkelhalbierenden.

Aus den relativen Gehalten der Xanthophyll-Pigmente konnte nun die Größe des Xanthophyll-Pools (VAZ) und der Epoxilierungsstatus (EPS, Thayer und Björkmann, 1990) berechnet werden:

$$VAZ = V + A + Z \quad (16.4)$$

$$EPS = \frac{2V + A}{2(V + A + Z)} \quad (16.5)$$

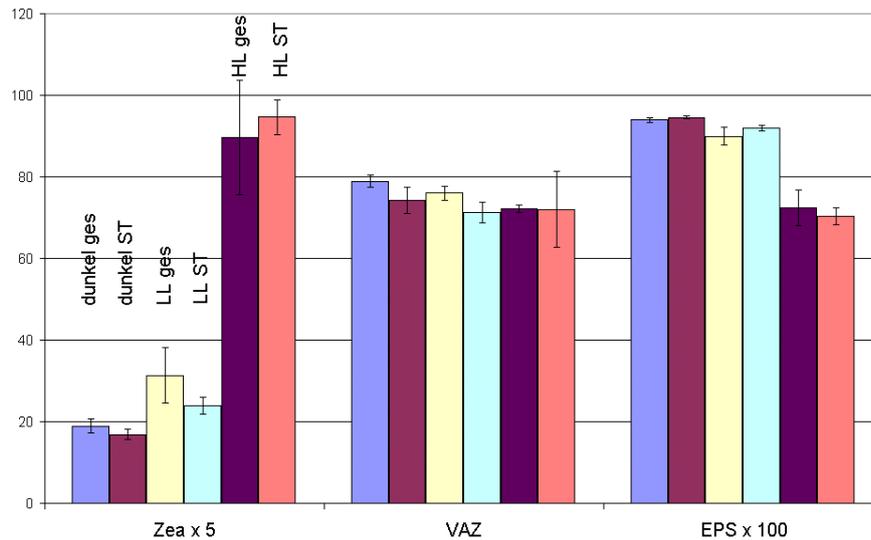
mit V: Violaxanthin-Gehalt  
 A: Antheraxanthin-Gehalt  
 Z: Zeaxanthin-Gehalt

Der EPS-Wert gibt die relative Anzahl der Epoxygruppen an, die vorliegen (Zeaxanthin hat keine, Antheraxanthin eine und Violaxanthin deren zwei). Liegt also alles Xanthophyll als Violaxanthin vor, so ist  $E = 1$ .

## 16.4 Ergebnisse

### 16.4.1 Absolute HPLC-Messwerte

Abbildung 16.5 stellt gemittelt über Blätter einer Gruppe (dunkel bzw. hell, LL. bzw. HL, gesund bzw. infiziert) den Zeaxanthin-Gehalt (*Zea*), die Gesamtgröße des Xanthophyll-Pools (*VAZ*) und den Epoxilierungsstatus (*EPS*) dar, wobei *Zea* und *EPS* für die Darstellung im gleichen Diagramm mit 5 bzw. 100 multipliziert wurden. Die beiden Pools (*Zea* und *VAZ*) sind auf den Chlorophyll-Gehalt der Blätter normiert.



**Abbildung 16.5:** Messergebnisse der Pigment-Bestimmung mittels HPLC: Zeaxanthin-Gehalt (*Zea*) im Verhältnis zum Chlorophyll-Gehalt (linke Säulengruppe, mit Faktor fünf skaliert), Xanthophyll-Pool-Größe (*VAZ*, Mitte) auch im Verhältnis zum Chlorophyll und Epoxilierungsstatus (*EPS*, rechte Säulengruppe, mit Faktor 100 skaliert). Es wurden jeweils über die Blattstücke gemittelt, die im Dunkeln geblieben waren bzw. solche, die Low- oder High-Light bekommen haben, unterschieden nach gesunden und mit *Seprotoria tritici* infizierten. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (*SEM*) an.

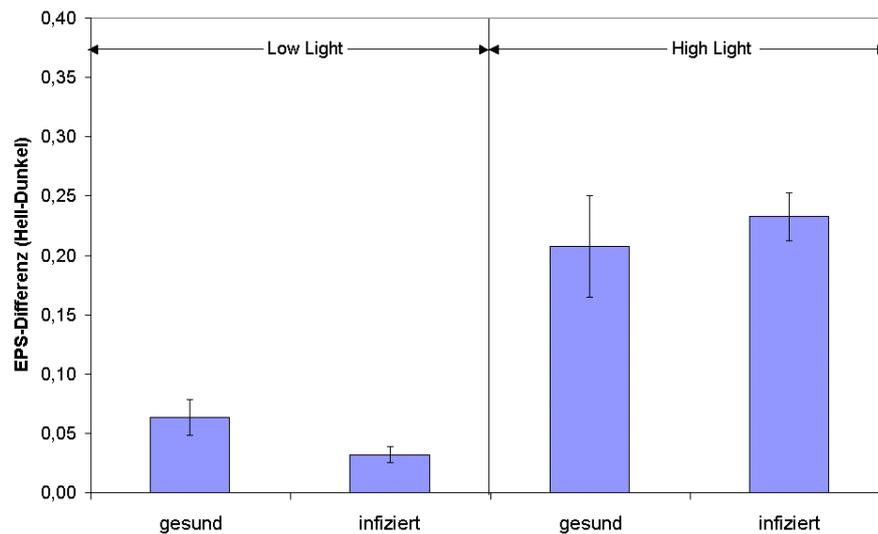
Die Gesamtgröße des *VAZ*-Pools zeigt bei allen Behandlungen keine signifikanten Unterschiede (mittlere Säulengruppe in Abbildung 16.5).

Deutlich zu sehen hingegen ist die Lichtabhängigkeit des Zeaxanthin-Gehaltes: Er steigt wie erwartet im Vergleich zu den dunklen Blättern im Licht an, bei HL ist dies sehr viel stärker als bei LL. Schwächer ausgeprägt ist der Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Blättern, welcher nicht signifikant ist.

Die Lichtabhängigkeit des Zeaxanthinwertes spiegelt sich im *EPS*-Wert (rechte Säulengruppe, Abb. 16.5) wider, tritt allerdings nicht so deutlich hervor. Der Einfluss der Infektion ist noch geringer als beim Zeaxanthingehalt. In der Dunkelheit ist bei beiden Sorten (gesund und infiziert) kein Unterschied zu sehen. Erst Licht scheint einen Unterschied zu bewirken, denn im Low-Light ist der *EPS*-Wert bei gesunden geringer als bei infizierten Blättern (der *EPS*-Wert verhält sich in Bezug zum Zeaxanthin-Gehalt invers zu diesem), es ist also bei letzteren weniger Zeaxanthin vorhanden. Die Unterschiede im *EPS*-Wert bei gesunden und infizierten Blättern sind jedoch nicht signifikant.

### 16.4.2 Licht-induzierte Änderungen des Zeaxanthingehaltes

In Abb. 16.5 waren die Unterschiede im EPS-Wert zwischen infizierten und nicht-infizierten Blättern nicht signifikant. Der Vorteil, dass relative Änderungen sich im Allgemeinen besser aus der statistischen Streuung als Absolutwerte herausheben, kommt deshalb zum Tragen, weil das beleuchtete Stück und das unbeleuchtete vom gleichen Blatt genommen wurden. In Abb. 16.6 sind die Differenzen zwischen unbeleuchtetem und beleuchtetem Blattstück dargestellt. Diese Differenzen sind es auch, die mit den noch folgenden 505nm-Messungen verglichen werden müssen.



**Abbildung 16.6:** Messergebnisse der Pigment-Bestimmung mittels HPLC: Differenzen des Epoxidierungsgrades des Xanthophyll-Pools. Es wurde jeweils die Differenz des EPS-Wertes vor und nach der Beleuchtung berechnet und dann über alle gesunden und mit *Septoria tritici* infizierten Blätter gemittelt, unterschieden nach Low- und High-Light. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an.  $N = 4-9$ .

Abbildung 16.6 bestätigt, was bei der Betrachtung der Absolutwerte in Abb. 16.5 noch nicht sichtbar wird: Bei wenig Licht (die beiden linken Säulen) ist die Veränderung des EPS-Wertes bei den gesunden Blättern deutlich größer als bei den infizierten; sie bilden also im Licht mehr Zeaxanthin. Dieser Unterschied verschwindet im Starklicht (rechte Säulen in Abb. 16.6).

## 16.5 Zeaxanthin-Bestimmung mittels 505-Signal bei Weizen

Die HPLC-Bestimmungen der licht-induzierten Zeaxanthin-Bildung sollte nun mit der optischen Absorptionsmessung bei 505 nm ( $T_{505}$ -Messung) verglichen werden. Bendixen et al. (2001) fanden eine sehr gute Übereinstimmung beider Methoden bei Bohne, so dass Hoffnung besteht, hier beim Weizen das Gleiche zu finden. Der optische Zugang hat die für biophysikalische Messmethoden typischen Vorteile der einfachen Durchführung und der Online-Registrierung.

Schon bei den Gasfluss-Messungen im Abschnitt 10.2.2 zeigt sich in Abb. 10.6 eine verringerte Zeaxanthin-Entwicklung in befallenen Weizenblättern im Vergleich zu gesunden. Im N-Projekt Sa359/13 war die licht-stimulierte Zeaxanthinbildung in  $\text{NH}_4^+$ -ernährten Pflanzen unterdrückt. Dort wurde es auf Ascorbatmangel zurückgeführt. Dies passt zur Annahme des Pilzprojektes, die davon ausgeht, dass pilzbefallene Pflanzen Ähnlichkeiten mit  $\text{NH}_4^+$ -ernährten Pflanzen haben. In der Hypothese ist ein hoher Spiegel an ROS beiden Szenarien gemeinsam, bei  $\text{NH}_4^+$ -ernährten als „technische Panne“ (woran die Pflanzen dann auch zugrunde gehen können), bei pathogenbefallenen „mit Absicht“ als Abwehrstrategie. In beiden Fällen sollte der Ascorbat Spiegel niedrig sei: Bei  $\text{NH}_4^+$ -ernährten Pflanzen aufgrund der starken Belastung der Radikale fangenden Systeme, bei pathogenbefallenen wäre ein hoher Ascorbat-Gehalt nicht sinnvoll, da Radikale erwünscht sind. Diese Hypothese erhält Unterstützung durch Abb. 10.6B, die eine geringe Zeaxanthin-Stimulierung in pilzbefallenen Pflanzen zeigt, denn für die Zeaxanthinbildung ist Ascorbat notwendig. In Abb. 14.17B wird auch gezeigt, dass pilzbefallenen Pflanzen tatsächlich mehr Radikale besitzen. Hier wird nun die optische Zeaxanthin-Bestimmung quantitativ ausgewertet werden.

### 16.5.1 Messablauf

Während der  $T_{505}$ -Messungen verblieben sowohl gesunde als auch mit *Septoria tritici* infizierte Weizenblätter an der Pflanze. Die Länge der Blätter erlaubte es, sie zu biegen, so dass Teile in die auch für Gasflussmessungen benutzte Messkammer (im Abschnitt 4.5.2 beschrieben) eingebaut werden konnten. Mit eingeschalteter Gasversorgung (300 ppm  $\text{CO}_2$ , 2%  $\text{O}_2$ , Rest:  $\text{N}_2$  mit 200 ml/min) wurden sie für 10 min dunkeladaptiert. 60 Sekunden nach Einschalten des Messlichtes (Int.  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) schaltete der Steuercomputer das aktinische Licht (LL:  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ein.

Die starke Drift, die bei  $T_{505}$ -Messungen leider auftritt (deshalb auch nur Differenzmessungen erlaubt), erforderte eine Driftkorrektur. Dafür wurde der Wert des 505-Signales zu Beginn der Messung (Einschalten des Messlichtes) ( $T_{Start}$ ) und dann direkt vor dem Einschalten des aktinischen Lichtes ( $T_0$ ) bestimmt (siehe auch Abbildung 16.7). Aus diesen beiden Werten wird die Steigung berechnet. Die Kenntnis dieser Steigung ermöglicht die Berechnung des driftkorrigierten  $T_{505}$ -Messwertes über lineare Extrapolation:

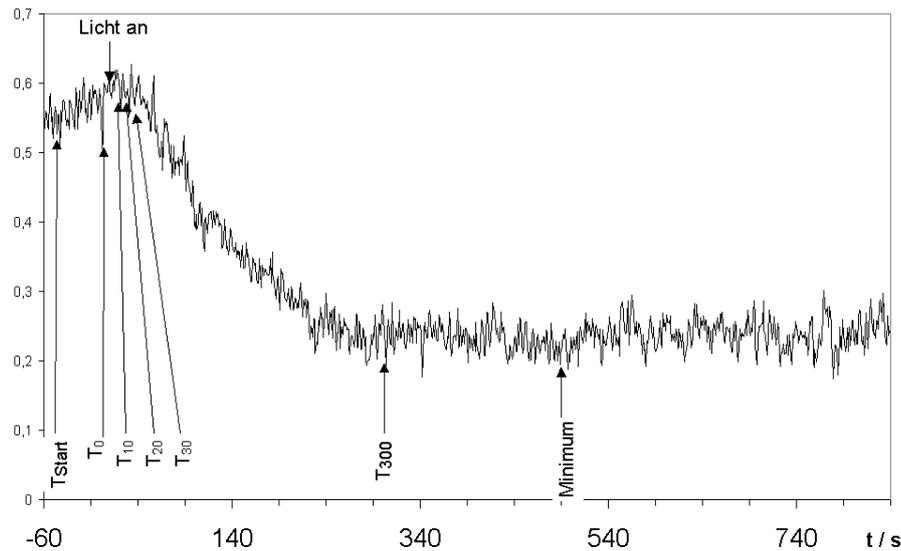
$$D_t = \frac{T_{Start} - T_0}{60} t \quad (16.6)$$

Der Beschreibung der licht-induzierten Änderungen im  $T_{505}$ -Signal dienen die Messwerte an den Zeitpunkten 10 s, 20 s, 30 s und 300 s nach Einschalten des aktin. Lichtes. Die driftkorrigierte Differenz zwischen dem Messwert des Zeitpunktes 300 s ( $T_{300}$ ) zum Zeitpunkt „Licht an“ ist der gesuchte Wert der Zeaxanthin-Änderung  $Z_x$ :

$$Z_x = Z_{300} - T_0 - D_{300} = T_{300} - T_0 - \frac{T_{Start} - T_0}{60} t \quad (16.7)$$

Entsprechend wurden Werte  $Z_{10}$ ,  $Z_{20}$  und  $Z_{30}$  für die Zeitpunkte 10 s, 20 s bzw. 30 s analog berechnet.  $Z_{30..300}$  bezeichnet die driftkorrigierte Differenz zwischen den Werten  $T_{30}$  und  $T_{300}$ :

$$Z_{30..300} = T_{30} - T_{300} - \frac{T_{Start} - T_0}{60} (300 - 30) \quad (16.8)$$



**Abbildung 16.7:** Beispielmessung 505-Signal in Transmission: Dunkeladaptiertes Weizenblatt wurde bei dem eingezeichneten Punkt mit Low-Light ( $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) beleuchtet. An den unten eingezeichneten Punkten wurden Messwerte aufgenommen und wie im Text beschrieben verrechnet.

Das Minimum des  $T_{505}$ -Signales zeigt die stärkste Zeaxanthin-Bildung an.

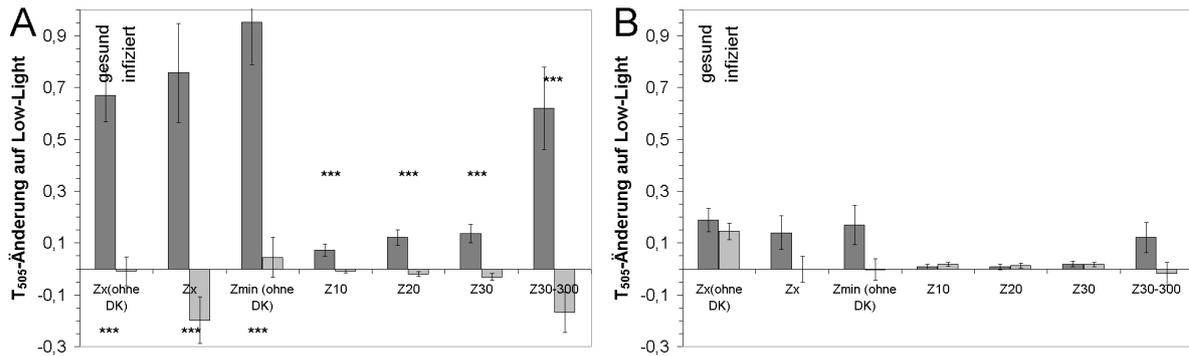
$$Z_{min} = T_0 - T_{min} \quad (16.9)$$

## 16.5.2 Ergebnisse

Die mit den Gleichungen 16.6 bis 16.9 berechneten Werte wurden jeweils für gesunde und infizierte Weizenblätter gemittelt und in der Abbildung 16.8 dargestellt. Alle Werte sind drift-korrigiert bis auf  $Zx(\text{ohne DK})$  und  $Z_{min}(\text{ohne DK})$ . Zusätzlich wurden die Mittelwerte für ein Signal auf statistisch signifikante Unterschiede getestet (t-Test,  $p=0.001$ , „\*\*\*“). Wie auch schon bei den Scattering-Messungen im Abschnitt 10.2.5 (S. 96) wurden Mess-Serien an zwei verschiedenen Zeitenpunkten (August/September 2003 und Juni 2004) gemacht. Abb. 16.8A korrespondiert mit 10.7 und Abb. 16.8B mit 10.11.

In Abb. 16.8A ergibt sich fünf Minuten nach Einschalten des Lichtes bei den gesunden Blättern ein deutlicher Abfall des  $T_{505}$ -Signales und damit eine erkennbare Zeaxanthin-Bildung, bei den infizierten ist dieses Signal deutlich schwächer ( $Zx(\text{ohne DK})$ ) bzw. sogar negativ ( $Zx$ ). Hier wird also fast gar kein Zeaxanthin gebildet oder vielleicht sogar welches abgebaut. Das *Minimum*-Signal zeigt gleiches Verhalten. Da die spektrale Trennung des Signals bei 505 nm von den benachbarten Signalen wie Scattering bei 535 nm und Thylakoid-Energetisierung bei 515 nm nicht vollständig möglich ist, gibt es ein optisches Übersprechen. Eine Erkennung des Zeaxanthin-Signales ist aber trotzdem möglich, da dieses von den anderen durch den Zeitbereich deutlich getrennt ist: A515 für die Thylakoidmembranspannung: 5 ms (Dau et al., 1991) und A535 für den pH-Gradienten: 10 s (Hansen et al., 1993).

Diese Trennung erkennt man sowohl in Abb. 16.7 am Zeitverlauf als auch im Balkendiagramm der Abb. 16.8. In der Abbildung 16.8 stellt  $Zx$  die Entwicklung des 505-Signals in den ersten 300 s nach Einschalten des Lichtes dar. Die Balken  $Z_{10}$ ,  $Z_{20}$  und  $Z_{30}$  zeigen die schnellen Änderungen an, also die Differenzen innerhalb von 10, 20 und 30 s nach „Licht an“. Dieser Signalanteil ist dem Übersprechen vom A535-Signal (Thylakoid-Energetisierung) zuzuschreiben.  $Z_{30-300}$ , die Veränderung ab 30 s bis zu 5 min, gibt den Anteil, der wirksam wird, wenn die Thylakoid-Energetisierung zur Ruhe gekommen ist, also von der Zeaxanthin-Bildung herrührt. Man erkennt (Abb. 16.8), dass sich innerhalb der ersten 30 Sekunden praktisch keine



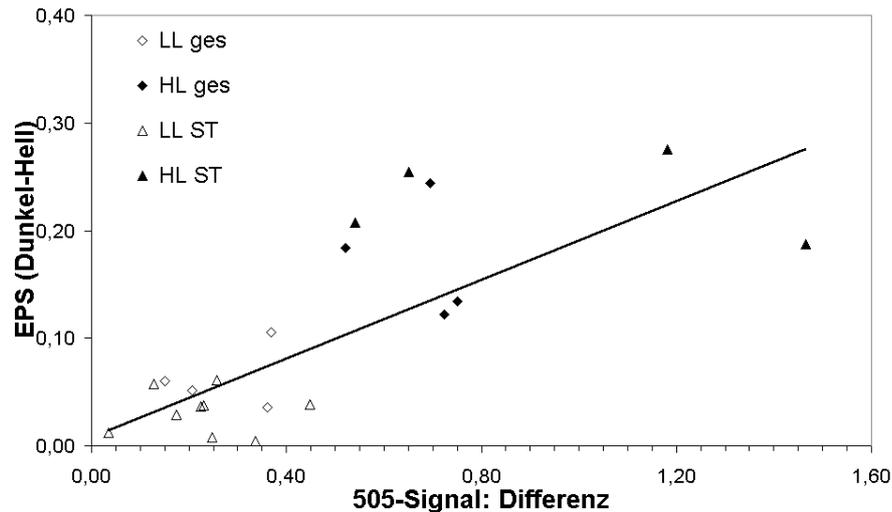
**Abbildung 16.8:** Zeaxanthin-Signal ( $T_{505}$ ) bei gesunden und mit *Septoria tritici* infizierten Weizenblättern. Aus den Messungen wie in Abb. 16.7 wurden an den eingezeichneten Messpunkten die Werte bestimmt und dann die Größen nach Gleichungen 16.6 bis 16.9 berechnet. Zx(ohne DK): Änderung des 505-Zeaxanthin-Signals nach Einschalten des Lichtes ohne Driftkorrektur, Zx: selbes Signal mit Driftabzug, Zmin (ohne DK): Differenz zwischen Minimum des Signals während der Messung und dem Wert zu Beginn (ohne Driftkorrektur), Z10 bis Z30: Veränderungen 10 bis 30 s nach „Licht an“, Z30-300: Veränderungen zwischen 30 s und 300 s nach „Licht an“, alle vier driftkorrigiert. Eingezeichnet sind die Mittelwerte ( $N_{\text{ges}} = 26$ ,  $N_{\text{inf}} = 41$ ). Bei den mit „\*\*\*“ markierten Säulen sind die Mittelwerte für gesund und infiziert signifikant ( $p = 0.001$ ). Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. (A) Messungen im August/September 2003 wie bei den Scattering-Messungen in Abb. 10.7, (B) Messungen im Juni 2004 wie bei den Scattering-Messungen in Abb. 10.11

Änderungen im 505-Signal ergeben, sondern erst danach. Damit weist dieser verzögerte Anstieg die beobachteten  $T_{505}$ -Änderung eindeutig der Zeaxanthin-Bildung zu. Alle Mittelwerte von gesunden und infizierten Blättern unterscheiden sich signifikant ( $p=0.001$ ).

In Abb. 16.8B sind die Anstiege wesentlich geringer als in Abb. 16.8A. Allerdings ergibt sich ein ähnliches Bild beim Zeitverlauf. Die Unterschiede zwischen gesunden und infizierten Blättern sind wesentlich geringer geworden und nicht mehr signifikant verschieden.

### 16.5.3 Vergleich von HPLC und Transmission bei 505 nm

Die Ergebnisse zur licht-induzierten Zeaxanthin-Bildung und die Abhängigkeit von der Infektion kommen bei der  $T_{505}$ -Messung erheblich besser heraus. Im Allgemeinen gilt aber die HPLC-Bestimmung als die zuverlässigere (aber scheinbar mit geringerem Auflösungsvermögen für behandlungsabhängige Differenzen). Um nun die Aussagekraft des Absorptionssignals bei 505 nm mit den Ergebnissen der Zeaxanthin-Bestimmung aus der HPLC zu vergleichen, wurde in der Abbildung 16.9 der EPS-Wert einer jeden gemessenen Blattprobe über dem zugehörigen 505-Signal aufgetragen. Die Messpunkte streuen etwas um die eingezeichnete Trendgerade. Ein ähnliches Ergebnis fanden Bendixen et al. (2001). Die Streuung muss man bei dem Vergleich zweier Methoden durchaus erwarten, und sie mindert nicht die Aussage, dass beide Verfahren im Mittel zum gleichen Ergebnis führen. Für das Verfolgen von pilzinduzierten Änderungen scheint das  $T_{505}$ -Signal zuverlässiger. Die Aufzeichnung eines ganzen Kurvenzuges ermöglicht ein Mittelungsverfahren per Auge, das Signale besser von stochastischen Schwankungen trennt als die Mittelung über punktförmige Messungen wie bei der HPLC.



**Abbildung 16.9:** Vergleich der Ergebnisse für die Zeaxanthin-Bestimmung aus den HPLC-Messungen und der Absorption bei 505 nm. Zu jedem Punkt gehört jeweils eine Differenzmessung dunkel-hell:  $T_{505}$  auf der x-Achse und der Epoxidierungsstatus auf der y-Achse. Die eingezeichnete Gerade ist die zu allen Punkten gehörende Trendgerade.

#### 16.5.4 Schlussfolgerungen

Die Untersuchungen dieser Arbeit gingen von der Hypothese aus, dass die Pflanze Pathogene durch erhöhte ROS-Produktion bekämpft (Rolke et al., 2004; Moore et al., 2002; Doke und Miura, 1995; Hückelhoven und Kogel, 2003). Im Stickstoffprojekt, das auch in dieser Arbeitsgruppe durchgeführt wird, zeigte sich, dass in ammoniumernährten Pflanzen die ROS-Produktion höher ist als in nitraternährten (Zhu et al., 2000). Bendixen et al. (2001) fanden, dass der ROS-bedingte höhere Ascorbat-Verbrauch in ammonium-ernährten Pflanzen zu einer Unterdrückung der licht-induzierten Zeaxanthin-Bildung führt. Dies führte zur Frage, ob auch in pilz-infizierten Pflanzen ein solcher Mechanismus die Zeaxanthin-Bildung unterdrücken könnte. Es gab bereits einige Hinweis in der Literatur (Bolwell und Wojtaszek, 1997; Hückelhoven et al., 2000; Baker et al., 2000). Die Messungen in diesem Kapitel geben eine eindeutige Antwort: Der Pilzbefall schwächt die Zeaxanthin-Bildung. Hierbei vermögen die  $T_{505}$ -Messungen diese Aussage deutlicher zu liefern als die HPLC-Messungen, eine insofern auch erfreuliche Feststellung, als die HPLC-Messung wesentlich aufwendiger in Bezug auf Arbeitszeit und Geräteinvestition ist.



# Kapitel 17

## Algenfluorometer

Eine der Aufgaben der vorliegenden Arbeit ist die Suche nach Eigenschaften des Fluoreszenz-Signales, das sich als Grundlage für eine Pathogenerkennung im Feld eignen könnten. In diesem Kapitel geht es um die spektralen Eigenschaften. Zum Beispiel sind Fluoreszenzsignale im Blau-Grünen aufgrund einer vermehrten Bildung von Lignin und phenolischen Substanzen bei Pilzbefall bekannt, z. B. Baker et al. (1989); Carver et al. (1992, 1998); Pearce et al. (1998); Smart et al. (1986); Wei et al. (1994); Cerovic et al. (1994); Pearce et al. (1998).

Für diese Untersuchungen geeignete Geräte sind Fluorometer, die zur *in-situ*-Identifikation von Phytonplankton-Arten eingesetzt werden. An beiden zur Zeit verfügbaren Geräten waren Ehemalige der Kieler Arbeitsgruppe Biophysik beteiligt. Das erste Gerät wurde von Jörg Kolbowski mit der Schreiberschen Gruppe in Würzburg entwickelt (Kolbowski und Schreiber, 1995). Das hier benutzte Gerät hatte Martin Beutler in seiner Dissertation (Beutler, 2003) im Rahmen eines BMBF-Projektes zusammen mit der Kieler Firma BBE Moldaenke und dem MPI für Limnologie in Plön entwickelt (Beutler et al., 2002, 2003, 2004).

### 17.1 Messaufbau und Ablauf

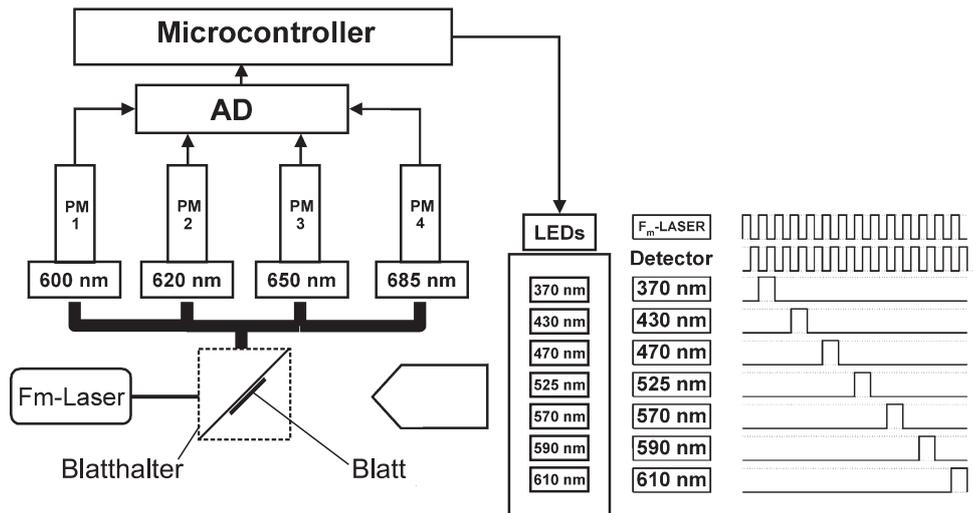
Abbildung 17.1 zeigt ein Funktionsdiagramm des Fluorometers. Wie in der Abbildung gezeigt, wird das Blatt auf einen Blatthalter aus Plexiglas montiert und unter einem Winkel von 45° zur Leuchtrichtung der sieben Anregungs-LEDs gestellt, die Licht der Wellenlängen 370, 430, 470, 525, 590 und 610 nm liefern. Die Fluoreszenzantwort des Blattes wird mit vier Photomultipliern detektiert bei vier Wellenlängen (600, 620, 650 und 685 nm), welche durch davor montierte Filter bestimmt werden.

So stehen für eine Messung insgesamt maximal 24 Anregungs-Emissions-Kombinationen zur Verfügung, welche allerdings nicht alle verwendet werden können, da die Filter vor den Detektoren für 600 und 620 nm auch das direkte Licht der 610 nm-LED durchlassen. Die entsprechenden Datenpunkte wurden deshalb in der Darstellung der Ergebnisse weggelassen.

Während einer Messung werden die LEDs mit 5 kHz nacheinander für 0,1 ms eingeschaltet, damit eine getrennte Erfassung über die zeitliche Differenzierung möglich ist. Der Microcontroller führt dann die zeitliche Zuordnung der AD-Wandler-Signale zu den Anregungswellenlängen durch. Die rechte Seite der Abbildung 17.1 zeigt das Zeitschema der LED-Taktung und Datenerfassung.

In der Photoynthese-Forschung haben sich die von Schreiber et al. (1986) festgelegten Fluoreszenz-Parameter durchgesetzt. Hier werden die von van Kooten und Snel (1990) zusammengefassten Definitionen benutzen:

- $F_0$ : Nach einer Dunkeladaption von 90 s erfolgt die Messung der *Dunkelfluoreszenz* in den nächsten 60 s. Während der gesamten Phase sind die Mess-LEDs jeweils 0.1 ms an und 5 ms aus, so ergibt sich über die Zeit gemittelte Messlichtintensität von ca.  $0,1 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .



**Abbildung 17.1:** Aufbau des Fluorometers: An dem Blatthalter aus Plexiglas wird ein Blatt befestigt und mit den LEDs angeregt. Vier Photomultiplier mit Filtern verschiedener Wellenlänge nehmen die Fluoreszenzantworten auf. Der Mikrocontroller erfasst die Werte der AD-Wandler und steuert die LEDs gemäß dem Schema auf der rechten Seite getaktet an. Der  $F_M$ -Laser erzeugt aktinisches Licht und sättigende Blitze.

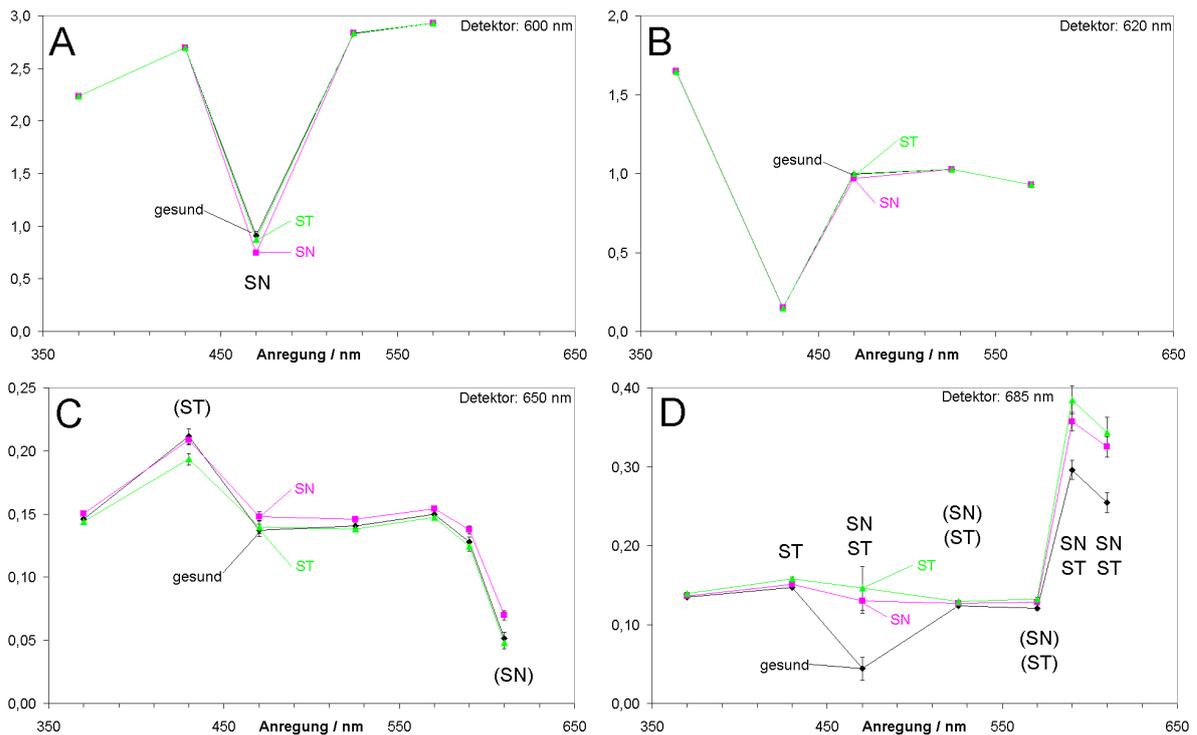
- $F_M$ : Die Laserdiode wird für 1 s eingeschaltet und die *Fluoreszenz mit sättigendem Licht* bei einer Intensität von ca.  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  erfasst.
- $F$ : 60 s nach dem Blitz wird die *Fluoreszenz* gemessen mit einer Messlichtintensität von unter  $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , die dadurch erreicht wird, dass die Leuchtdioden nach einer Leuchtzeit von ebenfalls 0,1 ms nur 0,1 ms aus sind.

## 17.2 Ergebnisse

Es wurden Fluoreszenzspektren von gesundem und mit *Septoria tritici* und *Septoria nodorum* infizierten Weizenblättern (bis 25 Tage nach Infektion) aufgenommen und dann über 160 (gesund), 237 (SN) oder 281 (ST) Datenpunkte gemittelt.

Diese gemittelten Spektren finden sind in den Abbildungen 17.2 ( $F_0$ ), 17.3 ( $F_M$ ) und 17.4 (F).

Zur Unterscheidung der Daten von gesunden und infizierten Blättern wurden jeweils t-Tests gerechnet (gesund gegen *Septoria tritici* und gesund gegen *Septoria nodorum*). Waren die Mittelwerte signifikant verschieden, so ist die entsprechende Wellenlänge in den Grafiken mit „ST“ bzw. „SN“ gekennzeichnet für  $p=0.001$  und mit „(ST)“ bzw. „(SN)“ für  $p=0.05$ .



**Abbildung 17.2:**  $F_0$ -Messungen mit dem Algenspektrometer bei Dunkelheit: Dargestellt ist die jeweilige Fluoreszenz-Emission bei sequenzieller Anregung durch die an der x-Achse angegebenen Wellenlängen. Detektion bei (A) 600 nm, (B) 620 nm, (C) 650 nm und (D) 685 nm. Die Messpunkte stellen den Mittelwert aus 160 (gesund), 237 (SN) oder 281 (ST) Messungen dar und sind der besseren Übersicht wegen durch Linien verbunden. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen gesund und infiziert sind mit „ST“ bzw. „SN“ gekennzeichnet für  $p=0.001$  und mit „(ST)“ bzw. „(SN)“ für  $p=0.05$ .

### 17.2.1 $F_0$ -Dunkelfluoreszenz

In der Dunkelfluoreszenz ( $F_0$ , Abb. 17.2) zwischen gesunden und infizierten Pflanzen treten bei den verschiedenen Detektionswellenlängen diese Unterschiede zutage:

- 600 nm (Abb. 17.2A): Signifikante Unterschiede sind zwischen den gesunden Blättern und denen mit der *Septoria-Nodorum*-Infektion bei 470 nm zu erkennen.
- 620 nm (Abb. 17.2B): Keine deutlichen Unterschiede sichtbar.
- 650 nm (Abb. 17.2C): Verschiedene Spektren sind über den ganzen Bereich erkennbar, wobei die Unterscheidung gesund-infiziert für *Septoria tritici* bei 430 nm signifikant wird, bei *Septoria nodorum* ist dies bei 610 nm der Fall.
- 685 nm (Abb. 17.2D): Hier ist *Septoria tritici* für den Bereich von 430–610 nm und *Septoria nodorum* für 470–610 nm signifikant von der Kontrolle verschieden.

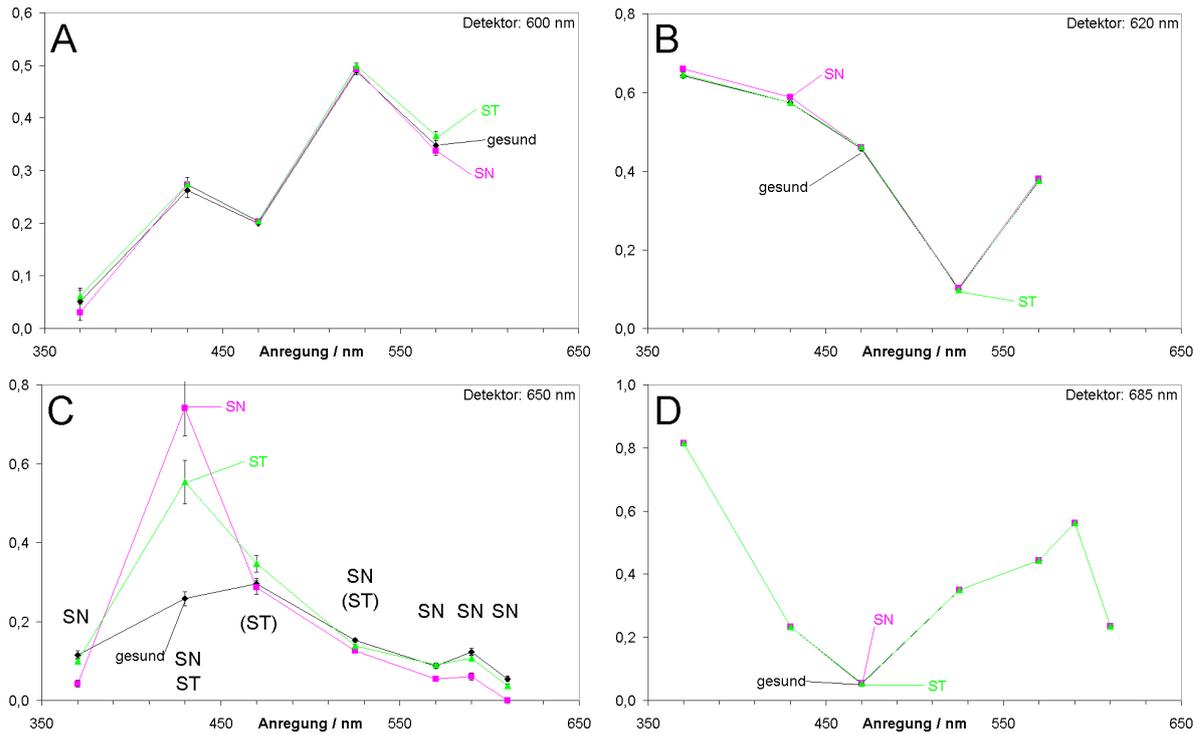


Abbildung 17.3:  $F_M$ -Messungen mit dem Algenspektrometer bei sättigendem Licht. Darstellung wie bei Abb. 17.2. Detektion bei (A) 600 nm, (B) 620 nm, (C) 650 nm und (D) 685 nm.

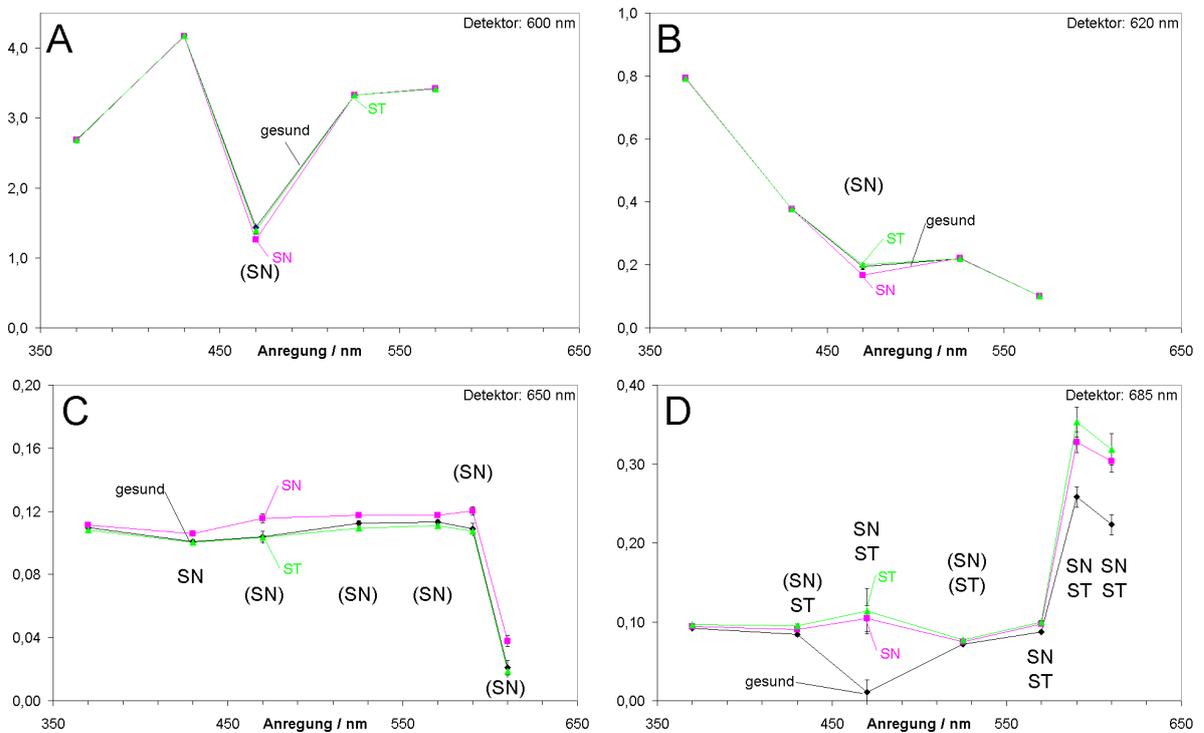


Abbildung 17.4:  $F$ -Messungen mit dem Algenspektrometer bei  $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aktin. Licht. Darstellung wie bei Abb. 17.2. Detektion bei (A) 600 nm, (B) 620 nm, (C) 650 nm und (D) 685 nm.

### 17.2.2 $F_M$ -Fluoreszenz (Blitz)

Während des sättigenden Blitzes ( $F_M$ , Abb. 17.3) zwischen gesunden und infizierten Pflanzen treten bei den verschiedenen Detektionswellenlängen andere Unterschiede auf:

- 600 nm (Abb. 17.3A): Keine deutlichen Unterschiede sichtbar.
- 620 nm (Abb. 17.3B): Keine deutlichen Unterschiede sichtbar.
- 650 nm (Abb. 17.3C): Das Spektrum für *Septoria tritici* ist im Bereich 430–525 nm signifikant von der gesunden Kontrolle verschieden, bei *Septoria nodorum* ist es der Bereich von 370–430 und 525–610 nm. Dabei setzen sich beide Infektionen unter Anregung bei 470 nm sehr deutlich von der Kontrolle ab.
- 685 nm (Abb. 17.3D): Identischer Spektren-Verlauf.

### 17.2.3 F-Fluoreszenz

Während des aktinischen Lichtes (F, Abb. 17.4) zwischen gesunden und infizierten Pflanzen treten bei den verschiedenen Detektionswellenlängen die folgenden Unterschiede zutage:

- 600 nm (Abb. 17.4A): Bei 470 nm ist *Septoria nodorum* von der Kontrolle signifikant verschieden.
- 620 nm (Abb. 17.4B): Ebenso ein Unterschied zwischen *Septoria nodorum* und gesund bei 470 nm.
- 650 nm (Abb. 17.4C): *Septoria tritici* ist von der Kontrolle fast nicht zu unterscheiden, wohingegen *Septoria nodorum* fast im gesamten Bereich (bis auf 370 nm) sich signifikant von den gesunden Blättern unterscheidet.
- 685 nm (Abb. 17.4D): Sowohl *Septoria tritici* als auch *Septoria nodorum* sind im Bereich 430–610 nm verschieden von der Kontrolle. Besonders große Unterschiede zeigen sich hier erneut bei 470 nm und bei 590–610 nm.

### 17.2.4 Zusammenfassung

Für die Detektionswellenlängen 600 und 620 nm treten praktisch keine Unterschiede zwischen gesunden und infizierten Blättern auf, unabhängig von der Anregungswellenlänge und dem Lichtprogramm. Bei der Detektion bei 650 und 685 nm finden sich zum Teil deutliche Unterschiede in den Messungen; diese beschränken sich aber zumeist auf den Anregungsbereich 470 und um 600 nm, liegen also im Bereich der phenolischen Substanzen (470 nm) bzw. der PS II-Fluoreszenz.

Da viele dieser Unterschiede auch statistisch signifikant sind, besteht die Möglichkeit, mit Spektren in diesem Wellenlängenbereichen eine Pilzerkennung an der Pflanze und auf dem Feld durchzuführen. Insbesondere bei einer Detektion bei 685 nm in Dunkelheit oder schwachem Licht (Abb. 17.2D bzw. 17.4D) ergibt sich bei einer Anregung mit 470 nm oder im Bereich um 600 nm eine Anhebung des Signals bei infizierten Blättern im Vergleich zur Kontrolle; in den anderen Anregungsbereichen hingegen passiert nichts, so dass es sich hierbei nicht nur um ein Skalierungsproblem handelt. Unter sättigenden Blitzten (Abb. 17.3D) könnte bei 650 nm der Unterschied bei einer Anregung ebenfalls mit 470 nm detektiert werden. Betrachtet man nun noch Abb. 17.4C, so könnte sogar eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Pilzarten möglich sein.

Ein passendes Gerät könnte demnach relativ einfach gebaut werden: Ein oder zwei Detektoren bei den genannten Wellenlängen und eine getaktete Anregung bei 470, 590 und 610 nm, wie sie auch schon bei dem verwendeten Fluorometer zum Einsatz kamen, sollten ausreichen, um

die hier gezeigten Unterschiede zwischen gesunden und infizierten Blättern messen und zeigen zu können. Ob diese Parameter allerdings für eine zweifelsfreie Pilzerkennung auf dem Feld ausreichen würden, die nicht von anderen abiotischen Faktoren beeinflusst wird, können nur weitere Versuche zeigen, die aber den Umfang dieser Arbeit sprengen würden.

# Kapitel 18

## Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein breites Spektrum an Methoden verwendet, die eine große Anzahl von Einzelergebnissen lieferten. Um einen Überblick über die sich daraus ergebenden Aussagen zu erhalten, wird dies im Folgenden zusammengestellt und unter dem Gesichtspunkt diskutiert, welchen Beitrag die vorliegende Arbeit zu den im DFG-Projekt Ha 712/16-1,2 aufgeworfenen Fragen geliefert hat, d. h.

- Pilzbefallerkennung vom fahrenden Traktor über die Chlorophyll-Fluoreszenz,
- Nachweis einer Kopplung zwischen Chloroplasten und Mitochondrien im Sinne der Arbeit von Guo et al. (2005),
- Einwirkung der Pilzinfektion auf die Verfügbarkeit von PS-I-Akzeptoren, insbesondere in Hinblick auf die Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung.

### 18.1 Infektionserkennung

Wie in der Einleitung beschrieben, war es Ziel dieser Arbeit und des zugehörigen DFG-Projektes, die photosynthetischen Signale auf ihre Eignung für die Infektionserkennung vom Traktor zu untersuchen. Der Vorteil dieser Signale ist ihre verhältnismäßig leichte Messbarkeit. Es stellt sich jedoch die Frage, ob die Pilzinfektion die Kopplung des Metabolismus an diese Signalwege so beeinflusst, dass es möglich wird, die Wirkung des Pilzes auf die Photosynthese nachzuweisen. Tabelle 18.1 stellt die Ergebnisse dieser Arbeit dazu zusammen.

Die Ergebnisse in Kapitel 5 entsprechen dem Effekt aus der Diplomarbeit Hammes (2000): eine Absenkung des Fluoreszenzsignales bei infizierten Blättern. Der photochemische Fluss  $J_{P,P}$  nach Beleuchtung wird kleiner. Dieser Effekt ist allerdings nur sehr schwach (Abb. 5.2). Er wird sich im Feld kaum aus den Variationen durch abiotischen Stress herausheben. Zusätzliches FR-Licht scheint eine Methode zu sein, den Effekt der Infektion auf die Thermik etwas deutlicher herauszuheben (Abb. 5.2). Ein wenig Hoffnung wurde auch auf FR-Licht als Eingangssignal gelegt, da die Pilzinfektion nach den Ergebnissen dieser Arbeit die Flussverteilung hinter PS I beeinflusst (Abb. 8.2). Aber auch hier ergeben sich nur sehr schwache Effekte, die nur beim Ausschlagsprung Signifikanz erreichen. Das dritte der betrachteten licht-induzierten Signale leitet sich von der Rückstellflanke der Blitzantwort ab (Abb. 7.1). Auch hier findet man Unterschiede, aber ihre Eignung für den Feldeinsatz dürfte an der geringen Ausprägtheit des Effektes scheitern.

In der Tabelle 18.1 sind auch noch andere Eingangssignale aufgeführt, die weder besonders signifikante Unterscheidungen zwischen infiziert und gesund erlauben noch für die Messung vom fahrenden Traktor geeignet sind. Dies gilt für die Absorption bei 505 nm im 10-Sekunden-Bereich (Membran-Energetisierung wie S535) oder im 300-Sekunden-Bereich (Zeaxanthin-Bildung), wie Abb. 16.8 zeigt, für die Betrachtung des Anteiles der offenen Stomata oder der stomatären Leitfähigkeit und der Nettophotosyntheserate (Abb. 12.4 und 12.5) oder für die Wirkung von Gasmodulation (Abb. 10.3 und 10.10).

**Tabelle 18.1:** Zusammenstellung aller Ergebnisse der Arbeit in Hinblick auf die Eignung photosynthetischer Signale für die Infektionserkennung. Die Spalte „Effekt“ gibt Veränderungen zwischen infizierten und gesunden Blättern an. \*Abkürzungen: „S:g,3“: deutlicher SHAM-Effekt bei gesunden oder vor drei Tagen infizierten; „S:1,2“: analog dazu am ersten und zweiten Tag; „g komp“: Bei gesunden Blättern wird der Akzeptorwegfall kompensiert, bei infizierten nicht; „n komp“: Akzeptorwegfall wird nicht kompensiert (weder bei gesund noch bei inf.).

Abb/ Tab	Signal	Input	Effekt	Neben- beding.	Inf. Tag	Jahres- zeit	Ausprä- gung
A11.1 –11.5	FC-Freq- gang	CO <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	A kleiner A größer	HL HL			schwach schwach
A7.1	Rück-Fl	Sätt.Licht	größer				schwach
A5.2 +T5.1	Thermik	Licht	kleiner	LL, HL mit FR	1–7 1–7		schwach schwach
A5.2	J <sub>P,P</sub>	Licht	kleiner	LL,HL ohne FR	1–7		schwach
A5.3 –5.4	Thermik Fluss	Licht Licht	größer kleiner	SHAM SHAM	8–25 8–25		schwach schwach
A5.5	Thermik Fluss	Licht Licht	kleiner größer	SHAM SHAM	1–7 1–7		schwach schwach
A8.2 A8.2	FC-Sprung FC	FR runter FR-Niveau	kleiner kleiner		1–4 1–7		schwach schwach
A16.8 A16.8 A16.8 A16.5 A16.5 A16.6	A505, 10s A505, 300s A505 EPS HPLC Zea HPLC EPS-Diff	Licht Licht Licht Licht Licht Licht	kleiner kleiner kein Eff. kleiner kleiner kleiner	   HL LL LL		Aug/Sept Aug/Sept Juni/Juli	mittel mittel  nicht sign nicht sign nicht sign
A17.2 –17.4	430, 470, 600	Licht	höher	F <sub>0</sub> , F <sub>M</sub> , F			<b>geeignet</b>
A12.4 A12.5 A12.5	Stomata Stom.Leitf. Netto-PS		schliessen kleiner kleiner		2–3(4) 2–3(4) 2–3(4)		deutlich deutlich deutlich
A10.2 A10.10 A10.7	J <sub>P</sub> J <sub>P</sub> Scattering	CO <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> Licht, CO <sub>2</sub> Licht, CO <sub>2</sub>	g komp* n komp* sinkt b.inf konstant	  LL HL		April 03 Juni 04 Okt/Sept Okt/Sept	  mittel mittel
A10.11	Scattering	Licht, CO <sub>2</sub>	konstant	LL,HL		Juni/Juli	
A14.20 A14.20 A10.12	ROS ROS FC-Sprung	  CO <sub>2</sub>	S:g,3* S:1,2* variabel			09–10.03 06–07.03 4.03–8.04	

Dass diese vom Traktor nicht messbaren Signale hier aufgelistet sind, hat den folgenden Grund: An ihnen wird die Variabilität der Signale deutlich. Diese tritt zum Beispiel bei der Wirkung des CO<sub>2</sub>-Sprunges auf den FC-Fluss auf: In Abb. 10.2 (auch Abb. 10.3, 10.4) wird bei Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration der photochemische Fluss J<sub>P</sub> vollständig von anderen Akzeptoren übernommen, die eine bessere ATP-Bilanz haben (deshalb der Anstieg des Gesamt-FC-Flusses); dies findet sich nicht bei infizierten Blättern. Dieser im April 2003 gemessene Effekt verschwindet im Juni/Juli 2004 (Abb. 10.10). Jetzt verhalten sich die gesunden wie die infizierten Blätter in

Abb. 10.2. Hierzu passt, dass im Juni/Juni 2004 die ROS-Bildung bei gesunden Blättern nicht auf SHAM reagiert (Abb. 14.20), die Rolle der Mitochondrien scheint an Bedeutung verloren zu haben, und der Export findet nicht mehr statt. Zu den anderen Jahreszeiten hingegen zeigt die SHAM-Empfindlichkeit die starke Funktion der AOX als Redoxvernichter für die Exporte aus den Chloroplasten an (Abb. 14.20). Damit einher geht die Fähigkeit, bei Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration, Redox-Äquivalente wie in Abb. 10.2 von PS I an die Mitochondrien abzugeben. Bei infizierten Blättern dieser Serie sinkt die SHAM-Empfindlichkeit und damit auch die Möglichkeit der Kompensation, so dass SHAM-Empfindlichkeit der ROS-Bildung (Abb. 14.20) und die FC-Sprungantwort (Abb. 10.2B) zusammenpassen.

Dieses Bild der jahreszeitlichen Abhängigkeit spiegelt sich auch im Verhalten des T505- und S535-Signales auf eine CO<sub>2</sub>-Erniedrigung bzw. einen Lichtsprung wieder (Abb. 10.7, 16.8). Die von der Erhöhung des Lichts bzw. Absenkung des CO<sub>2</sub> induzierte Erhöhung der Membran-Energetisierung wird in den Messungen von Aug./Sept. kleiner, wenn die Blätter infiziert sind (Abb. 10.7 bzw. Kurzzeiteffekte in Abb. 16.8), also wenn unter Low-Light die verminderte SHAM-Empfindlichkeit eine geringere Beteiligung der AOX am Verbrennen überflüssiger Redox-Äquivalente anzeigt. Unter High-Light werden die Effekte auf die Membran-Energetisierung weniger sichtbar. Es kann sein, dass ein Sättigungseffekt bei hohen Flüssen den Einfluss des Umschaltens auf mitochondriale Akzeptoren verdeckt. Im Juni/Juli hingegen verschwindet mit der SHAM-Empfindlichkeit der gesunden Blätter auch die stimulierende Wirkung der Elektronenakzeptorumschaltung auf die Membran-Energetisierung (Abb. 10.11).

Dass jahreszeitliche Variabilität tatsächlich eine große Rolle spielt, veranschaulicht Abb. 10.12: Hier sind charakteristische Größen der Antwort auf eine CO<sub>2</sub>-Erniedrigung über den Monaten April 2003 bis August 2004 aufgetragen. Man sieht eine fast sinusförmige Variation im Jahresverlauf.

Zu dieser Abhängigkeit von der Jahreszeit kommt noch die Abhängigkeit von der Infektionsdauer: In Tabelle 5.2 ist zu sehen, dass SHAM auf die Flüsse am Tag 1–7 nach Infektion den entgegengesetzten Effekt hat wie an den Infektionstagen 8–25. Aber auch im oben berichteten Komplex des Zusammenhanges zwischen SHAM-Empfindlichkeit, Kompensation der PS-I-Akzeptoren und Scattering tauchte auf, dass die Infektionswirkung, die am 1. und 2. Infektionstag gut sichtbar ist, am 3. Tag wieder verschwindet (Abb. 14.20). Ebenfalls zeigen die FR-Blitz- und FR-Sprung-Messung (Abb. 8.4) eine solche Abhängigkeit vom zeitlichen Abstand nach Infektion: Bis zum Tag 7 finden sich deutliche Unterschiede, die danach vollständig verschwinden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen also, dass die Chlorophyll-Fluoreszenz durch die metabolischen Veränderungen, die ein Pilzbefall verursacht, nicht so signifikant verändert wird, dass Effekte dieser Art für Diagnosezwecke im Feld benutzt werden könnten. Insbesondere fehlt die Möglichkeit des Labors: das differentielle Messen, also der Vergleich von infizierten und nicht-infizierten Blättern, die unter gleichen Bedingungen angezogen worden sind.

Ein Hoffnungsschimmer ergibt sich jedoch aus den spektralen Untersuchungen im Kapitel 17: Insbesondere im Bereich 470 und 430 nm treten starke Unterschiede in den Anregungsspektren für ausgewählte Detektorwellenlängen auf. Dabei ergeben sich bei Messungen dieser Art die folgenden Vorteile:

- Es muss keine Kinetik gemessen werden, das verkürzt die Messzeit.
- Es sind Vergleichsmessungen möglich. Das ergibt eine automatische Skalierung, weil Spektralbereiche mit und ohne Beeinflussung durch die Infektion simultan gemessen und verglichen werden können.
- Der Aufwand ist sehr gering. Es genügen einige LEDs mit verschiedenen Emissionswellenlängen und ein bis zwei Detektorstreifen mit einfachen Korrelatoren, um die modulierten Signale zu trennen.

In diesem Zusammenhang wäre es möglich, dass die Firma *bbe Moldaenke* (der Inhaber dieser Firma ist früherer Diplomand der Arbeitsgruppe) das von Martin Beutler (Beutler et al., 2002, 2003, 2004) in Kooperation mit dem ZBM, dem MPI in Plön und der Firma *bbe Moldaenke* entwickelte Algenerkennungsgerät für den Einsatz auf dem Traktor anpassen kann.

## 18.2 Elektronenfluss-Verzweigung hinter PS I

Die Flussverzweigung hinter PS I zu verschiedenen Akzeptoren ist Gegenstand aktueller Forschung. Die wichtigsten Wege sind im Kapitel 10 beschrieben und in Abb. 10.8 dargestellt. Hier soll betrachtet werden,

- was die vorliegende Arbeit zur Verifizierung und Spezifizierung dieser Wege beitragen kann
- und inwieweit die Funktion der Wege durch eine Pilzinfektion beeinflusst wird (Abschnitt 18.3).

Die Hinweise zum ersten Teil der Frage, also zur Elektronenfluss-Verzweigung hinter PS I, sind in Tabelle 18.2 zusammengestellt.

Von grundsätzlicher Bedeutung sind die Versuche zur Kompensation von O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Modulation in Abb. 9.5 und 9.6. Sie zeigen, dass weitere Akzeptoren ausser Carboxylierung und Oxygenierung am Calvin-Zyklus beteiligt sind (Abb. 10.2 und 10.4). Diese Ergebnisse sind überzeugender als die Feststellung, dass die CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Frequenzgänge in Abb. 9.3 verschieden sind, da erstere auf einer Simultanmessung der Wirkung beider Gase beruhen und damit etwaige Veränderungen des Systems, wie sie zwischen zwei Frequenzgangmessungen stattgefunden haben könnte, auszuschließen sind.

Unterstützt wird dies von den Frequenzgangmessungen im Kapitel 11, bei denen Inhibitoren zumindest unter Low-Light zu Formveränderungen (Kerbe, hochfrequenter Buckel bei O<sub>2</sub>-Modulation, 180°-Phasendrehung) führen.

Die Beteiligung anderer PS-I-Akzeptoren neben der Carboxylierung ist also gesichert. Die Identifikation, welcher Art diese Akzeptoren sind, ist dagegen schon schwieriger. Im Folgenden werden die Hinweise auf die verschiedenen möglichen Akzeptoren diskutiert:

**Photorespiration:** In Abb. 10.9 bewirkt eine Erniedrigung der O<sub>2</sub>-Konzentration eine Erhöhung des thermischen Flusses. Wie dort diskutiert, kann eine O<sub>2</sub>-Erniedrigung weder die Elektronenaufnahme bei der Mehler-Reaktion noch in den Mitochondrien fördern. Der einzige Mechanismus, der sich dafür anbietet, ist die Photorespiration.

Ein Hinweis auf Photorespiration in Gegenwart von Inhibitoren bei gesunden und infizierten Blättern findet sich auch im Kapitel 11 bei den FC-Frequenzgängen unter High-Light. Fast durchgehend ergibt sich eine Erniedrigung der Modulationswirkung von CO<sub>2</sub> gekoppelt mit einer Erhöhung der Empfindlichkeit für O<sub>2</sub>. Dies kann mit einer erhöhten Photorespiration erklärt werden: Wenn die Oxygenierung die Rolle der Carboxylierung teilweise unter Inhibitorwirkung übernimmt, dann würde sich an der Form der Frequenzgänge nichts ändern, was bei den High-Light-Frequenzgängen des Kapitels 11 vorliegt. Allerdings besteht hier noch ein großer Bedarf an weiterer Forschung. Das Umschalten von Carboxylierung auf Oxygenierung würde man bei SHAM plus Antimycin A erwarten, aber merkwürdigerweise tritt dieser Effekt bei Glyceraldehyd auf, wo es eigentlich schlechter erklären lässt. SHAM allein wirkt nur beim CO<sub>2</sub>-Frequenzgang.

Es stellt sich also bei den Frequenzgängen die Frage, ob eine Modulierung des O<sub>2</sub> in den Mitochondrien mit ähnlicher Zeitkonstante wirkt wie die von CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> auf die RubisCO und damit das gleiche Verhalten erzeugen würde, wie das Umschalten auf Oxygenierung an der RubisCO. Das Schließen der Stomata bei Pilzinfektion (Abb. 12.4) und die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber O<sub>2</sub> in Abb. 10.9 unterstützen aber auf jeden Fall die Hypothese einer erhöhten Photorespiration.

**Mehler-Reaktion:** Das Auftreten des hochfrequenten Buckels in den O<sub>2</sub>-Frequenzgängen (Abb. 11.2) unter Glyceraldehyd und Low-Light könnte ein Hinweis auf die Mehler-Reaktion sein, da deren Versorgung mit O<sub>2</sub> direkt ohne zeitliche Verzögerung ihrer Saugkraft als PS-I-Akzeptor wirksam wird. Hier wären photoakustische Messungen sehr nützlich. Wie von Schinner et al. (1998) gezeigt, kann die Mehler-Reaktion den an PS II entwickelten Sauerstoff wieder einfangen, die anderen O<sub>2</sub>-Verbraucher hingegen reagieren dafür zu langsam. Diesen Effekt kann man benutzen, um eine Beteiligung der Mehler-Reaktion zu zeigen. Im Rahmen der Arbeit fehlte aber leider die Zeit, den zuvor in der AG verwendeten Photoakustik-Messplatz wieder herzurichten.

**Mitochondrien:** Experimentelle Beweise für die Beteiligung der Mitochondrien sind konkreter: Bereits oben bei der Diskussion der Eignung photosynthetischer Signale für die Erkennung von Pilzinfektionen vom Traktor aus ist auf die Kopplung zwischen einer SHAM-Empfindlichkeit (Abb. 14.20) und dem Auftreten einer vollständigen Übernahme des Elektronenflusses bei CO<sub>2</sub>-Erniedrigung (Abb. 10.2 und 10.4) hingewiesen worden.

Die Koinzidenz der jahreszeitlichen Schwankungen des Typs der FC-Antwort auf den CO<sub>2</sub>-Sprung (Abb. 10.3 gegenüber 10.10) und der SHAM-Empfindlichkeit der ROS-Bildung ist ein weiterer starker Hinweis auf die Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung.

Die Wirkungen von Oligomycin und SHAM auf die Rückstellflanke nach sättigenden Blitzen (Abb. 6.6) zeigen direkt die Rolle der Mitochondrien bei der Entladung des PS-I-Akzeptor-Pools. Etwas schwerer zu verstehen ist der SHAM-Effekt in Abb. 5.3 und 5.4, dass bei SHAM im Gegensatz zur unvergifteten Kontrolle die Thermik fällt und der Fluss steigt. Hier liegt offenbar die Verschiebung auf eine Elektronensenke vor, die mehr ATP/Fluss verbraucht als die Mitochondrien, und es wäre damit ein Hinweis darauf, dass mit SHAM eine vorher bestehende mitochondriale Senke für PS-I-Elektronen beseitigt wurde.

Die Aktivität der Mitochondrien im Dunkeln und die Rolle der AOX zur Unterdrückung der ROS-Bildung wird sehr deutlich in Abb. 15.2: Im Hinblick auf die Frage der Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung zeigen diese Versuche sehr deutlich, dass NAD(P)H aus den Chloroplasten exportiert wird. Es kann allerdings nicht zwischen den genannten hypothetischen Mechanismen der Senkung der DCF-Fluoreszenz unterschieden werden.

**Zyklischer Transport um PS I:** Die Arbeit erbrachte nur einen schwachen Hinweis auf die Beteiligung des in vielen Arbeiten, besonders aus der Würzburger Heber-Gruppe (Katona et al., 1992; Kobayashi und Heber, 1994), geforderten zyklischen Elektronentransportes um PS I: die Beschleunigung der Rückstellflankenentladung (Abb. 6.3) unter Antimycin A. Dies wurde hier so erklärt, dass die Unterbindung des Rückfließens vom PS-I-Akzeptor-Pool zum PQ-Pool die Entladung der Pools beschleunigt.

**Zusammenfassend** lässt sich sagen, dass Hinweise auf Photorespiration, Mehler-Reaktion und zyklischen Transport vorhanden, aber dass noch weitere Experimente zur Verifizierung notwendig sind. Allerdings bieten die experimentellen Ansätze dieser Arbeit, wie z. B. die Untersuchung der Rückflanken der sättigenden Blitze oder die Kopplung der Messung des hochfrequenten Buckels bei O<sub>2</sub>-Modulation zusammen mit Photoakustik-Messungen, neue Chancen.

Die Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung hingegen ist durch die Versuche der vorliegenden Arbeit weiter bestätigt worden.

**Tabelle 18.2:** Zusammenstellung aller Ergebnisse der Arbeit in Hinblick auf Hinweise zur Elektronenfluss-Verzweigung hinter PS I. \*Abkürzungen: Ko: Kontrolle (Wasser), SH: SHAM, Gl: Glycerinaldehyd, An: Antimycin, SA: SHAM+Antimycin, Ol: Oligomycin; „Fluss-Umsch.“: Umschaltung auf Wege mit weniger ATP-Verbrauch; „S:g,3“: deutlicher SHAM-Effekt bei gesunden oder vor drei Tagen infizierten; „S:1,2“: analog dazu am ersten und zweiten Tag; „g komp“: Bei gesunden Blättern wird der Akzeptorwegfall kompensiert, bei infizierten nicht; „n komp“: Akzeptorwegfall wird nicht kompensiert (weder bei gesund noch bei inf.).

Abb/ Tab	Signal	Input	Effekt	Neben- bed.	Inf. Tag	Jahres- zeit	Aus- sage
A9.3	FC-Freq- gang	CO <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Unterschiedl. Verläufe				nicht nur RubisCO
A9.5 A9.6 T9.1	Kompen- sations- art	CO <sub>2</sub> / O <sub>2</sub>	Schnittpkte komplex	bei HL mehr als LL			nicht nur RubisCO
A10.2	FC	CO <sub>2</sub> - Sprung	keine Senkng des $J_P$				PS-I-Um- schalten
A10.4	Thermik +El-Fluss	CO <sub>2</sub> - Sprung	Thermik steigt	HL			Fluss- umsch.*
A10.9	FC Scatter.	O <sub>2</sub> -Sprung O <sub>2</sub> -Sprung	Fluss steigt Thermik steigt	HL HL			Photoresp. Fluss- umsch.*
A11.1 -11.5	FC- Fre- quen- gang	O <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	HF-Buckel Kerbe Inversion Inversion	Gl, LL Gl, SA, LL HL, SH HL, SH			Mehler Akzept. Photoresp. Photoresp.
A6.3 A6.6	Rückfl. Rückfl.	Sätt.Licht Sätt.Licht	Kleinere RF Höhere RF	An SHAM, Ol			Zykl.PSI Export an Mitos
A5.3 A5.4 A5.5	$J_T/J_P$ $J_T/J_P$ $J_T/J_P$	Licht Licht+FR Licht	fällt/steigt fällt/steigt kein Eff.	SH/Ko SH/Ko SH/Ko	8-25 8-25 1-7		Mito-Senke Mito-Senke
A14.16 A14.18 A14.19	ROS ROS ROS	5h Licht 2400s Licht Dunkel +Licht	hoch kein Eff. weniger als Kontr.	SH, HL SH, ges SH, Gl	1		Mito ROS
A14.13	ROS	Infekt.	Aufhellung	SHAM			
A15.2 A15.2	ROS ROS	Dunkel Licht	Anstieg Abnahme	SHAM SHAM			Rolle d.AOX NADH-Exp.
A12.4 A12.5 A12.5	Stomata St.Leitf. Netto-PS		Schliessen kleiner kleiner	Inf. Inf. Inf.	2-3(4) 2-3(4) 2-3(4)		Photoresp.
A10.2 A10.10 A10.7	$J_P$ $J_P$ Scatter.	CO <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> Licht+CO <sub>2</sub> Licht+CO <sub>2</sub>	g komp* n komp* sinkt b.inf. konstant			April 03 Juni 04 Okt/Sept Okt/Sept	Koinzid. bei SHAM zwischen FC-
A10.11 A14.20 A14.20 A10.12	Scatter. ROS ROS FC- Sprung	Licht+CO <sub>2</sub> Licht+CO <sub>2</sub> CO <sub>2</sub>	konstant S:g,3* S:1,2* variabel	LL HL LL, HL		Juni/Juli 09-10.03 06-07.03 4.03-8.04	Antwort und ROS- Bildung

### 18.3 Wirkung der Pilzinfektion auf die Umschaltung der PS-I-Akzeptoren

Die Zusammenstellung in Tabelle 18.3 ergibt einige Hinweise auf eine Abschaltung der Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung. Abb. 10.2 zeigt, wie in gesunden Pflanzen nach Absenkung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration der photochemische Fluss erhalten bleibt, die Membran-Energetisierung aber steigt. Das bedeutet, dass auf einen PS-I-Akzeptor umgeschaltet wird, der weniger ATP pro Elektronfluss verbraucht. Bei Pilzinfektion verschwindet dieser Akzeptor. Die Unterstützung dieses Ergebnisses durch die Koinzidenz mit den jahreszeitlichen Schwankungen der SHAM-Empfindlichkeit der ROS-Bildung (Abb. 14.20) und der licht- und  $\text{CO}_2$ -induzierten Membran-Energetisierung war bereits oben beim Problem der Pilzerkennung und der Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung erwähnt worden.

Das Konzept einer pilz-induzierten Abschaltung dieser Kopplung wird durch die Ergebnisse der Messungen der Blitzrückstellflanken unterstützt. Bei Pilzinfektion wird der Effekt von Oligomycin unter LL schwächer, unter HL verschwindet die Oligomycin-Wirkung ganz (Abb. 7.2). Unter SHAM steigt bei den Frequenzgang-Messungen (Abb. 11.3) die Empfindlichkeit für  $\text{O}_2$  und es sinkt die für  $\text{CO}_2$ . Dies kann bedeuten, dass die Abschaltung der mitochondrialen Akzeptoren die Photorespiration stärkt. Dies würde einhergehen mit der in Abb. 12.4 beobachteten Verminderung der Stomata-Öffnungen und dem Absinken der Netto-Photosyntheserate.

Die Messungen zur ROS-Bildung unter SHAM im Kapitel 15 zeigen, dass in infizierten Blättern die mitochondriale Aktivität sowieso heruntergefahren ist und dass damit wohl auch die Kapazität für die Aufnahme chloroplastischer Redox-Äquivalente herabgesetzt ist.

Aus der mit DAB gemessenen räumlich aufgelösten ROS-Bildung ergibt sich kein wesentlicher Hinweis auf Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung. Die Bilder 14.6 und 14.9 zeigen eine ROS-Bildung in oder an den Chloroplasten. Die Vermutung, dass kleine Punkte auf den Chloroplasten liegen, bedürfte zur Verifizierung eines höheren räumlichen Auflösungsvermögens, so dass die Frage der Lokalisation der ROS-Bildung offen bleibt.

**Tabelle 18.3:** Zusammenstellung der Versuche der Arbeit zur Wirkung der Pilzinfektion auf die Umschaltung der PS-I-Akzeptoren. Die Spalte „Effekt“ gibt Veränderungen zwischen infizierten und gesunden Blättern an. \*Abkürzungen: Ko: Kontrolle (Wasser), SH: SHAM, Gl: Glyceraldehyd, An: Antimycin, SA: SHAM+Antimycin, Ol: Oligomycin; „S:g,3“: deutlicher SHAM-Effekt bei gesunden oder vor drei Tagen infizierten; „S:1,2“: analog dazu am ersten und zweiten Tag; „g komp“: Bei gesunden Blättern wird der Akzeptorwegfall kompensiert, bei infizierten nicht; „n komp“: Akzeptorwegfall wird nicht kompensiert (weder bei gesund noch bei inf.).

Abb/ Tab	Signal	Input	Effekt	Neben- bed.	Inf. Tag	Jahres- zeit	Aus- sage
A10.2	FC	CO <sub>2</sub> - Sprung	keine Senk- ung des $J_P$				PS-I- Umschalten
A10.4	Thermik	CO <sub>2</sub> - Sprung	kaum Effekt				Selbe ATP- Bilanz
A10.9	FC, Scat	O <sub>2</sub> -Sprung	großer Eff.	HL			Photoresp.
A11.1	FC-	CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	fällt/steigt	HL, Ko			Photoresp.
A11.2	Fre-	CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	fällt/steigt	HL, Gl			Photoresp.
A11.3	quenz-	CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	fällt/steigt	HL, SH			Photoresp.
A11.4	gang	CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub>	fällt/steigt	HL, An			Photoresp.
A7.2	Rück-	Sätt.-	Olig.-Effekt	(LL) HL			Export
A7.3	flanken	Licht	weg bei inf				reduziert
T5.2	$J_T/J_P$	Licht	steigt/fällt	SHAM	8–25		
A5.5	$J_T/J_P$	Licht	fällt/steigt	SHAM	1–7		
T5.2	$J_T$	Licht	steigt	Gl LL+FR	1–7		
A14.6	ROS	Chl-F/DCF	zusammen				
A14.9	ROS	Chloropl.	Punkte				
A14.18	ROS	2400s Licht	kein Effekt	SH, ges			
A14.19	ROS	Dunkel	weniger	SH, Gl			
A14.13	ROS	+Licht Infekt	ROS Aufhellung	SHAM			
A15.2	ROS	Dunkel	Anstieg	SHAM			Rolle d.AOX
A15.2	ROS	Licht	Abnahme	SHAM			NADH-Exp.
A12.4	Stomata		Schließen	Inf.	2-3(4)		Photoresp.
A12.5	St.Leitf.		kleiner	Inf.	2-3(4)		
A12.5	Netto-PS		kleiner	Inf.	2-3(4)		
A10.2	$J_P$	CO <sub>2</sub>	g komp*			April 03	Chlo- roplas-
A10.10	$J_P$	CO <sub>2</sub>	n komp*			Juni 04	ten-
A10.7	Scatter.	Licht, CO <sub>2</sub>	sinkt b.inf.	LL		Okt/Sept	Mito- chon-
A10.11	Scatter.	Licht, CO <sub>2</sub>	konstant	HL		Okt/Sept	drien-
A14.20	ROS	Licht, CO <sub>2</sub>	konstant	LL, HL		Juni/Juli	Kopp- lung
A14.20	ROS		S:g,3*			09–10.03	
A14.20	ROS		S:1,2*			06–07.03	
A10.12	FC- Sprung	CO <sub>2</sub>	variabel			4.03–8.04	

## 18.4 Hinweise zur Pilzabwehr

ROS-Bildung ist eine verbreitete Methode der Pilzabwehr (Rolke et al., 2004; Moore et al., 2002; Doke und Miura, 1995; Hückelhoven und Kogel, 2003). Dass reaktiver Sauerstoff bei einer Infektion mit *Septoria tritici* gebildet wird, zeigen zum einen die Mikroskop-Aufnahmen in Abb. 14.9 und der befallenen Stellen in 14.10 sowie zum anderen der geringere Zeaxanthin-Gehalt infizierter Blätter (Abb. 16.8).

Auf der Ebene der Organellen der Zelle wären zumindest drei große Quellen für ROS denkbar: Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen. Es ergaben sich allerdings nur schwache Hinweise darauf, ob diesen die Erzeugung von ROS zur Pilzabwehr zugeschrieben werden kann.

**Chloroplasten:** Es zeigte sich in Abb. 14.17B bei unvergifteten Blättern kein Unterschied in der ROS-Erzeugung zwischen gesunden und infizierten Pflanzen nach Einschalten des Lichtes. Also scheinen die Chloroplasten nicht direkt ROS für die Pilzabwehr zu erzeugen. Wäre dies indes die Hauptquelle für die Abwehr, so würde die Pflanze vor dem Problem stehen, in der Nacht nichts gegen einen eindringenden Pilz tun zu können. Andererseits zeigen die Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop in der Abb. 14.9 ROS-anzeigende Punkte auf oder in den Chloroplasten und in Abb. 14.6 einen räumlichen Zusammenhang zwischen der grünen DCF-Fluoreszenz und der roten Chlorophyll-Fluoreszenz. Das Problem ist, dass die sehr kleinen Peroxisomen oder Mitochondrien, wie bei Del Río et al. (1998) gezeigt, direkt auf der Oberfläche der Chloroplasten sitzen können und damit eine räumliche Trennung nicht mehr möglich ist.

**Mitochondrien:** Die geringere SHAM-Empfindlichkeit bei infizierten Blättern in den Abb. 15.3 und 14.20B kann zwei Ursachen haben:

- Die mitochondriale Aktivität könnte heruntergefahren sein.
- Die AOX könnte ausgeschaltet sein, damit in den Mitochondrien verstärkt ROS zur Pilzabwehr produziert werden kann.

Wenn der zweite Punkt zutreffen würde, dann müsste das ROS-Level bei infizierten Blättern höher sein und vor allem ähnlich hoch wie bei gesunden unter SHAM. Dies wird aber nicht beobachtet (z. B. Abb. 14.20A, B). Also liegt der Schluss nahe, dass die mitochondriale Aktivität heruntergefahren wird und sie nicht Quelle des ROS für die Abwehr sein kann.

**Peroxisomen:** Die Peroxisomen sind auch in der Lage, ROS zu produzieren, z. B.  $H_2O_2$  im Photorespirationsweg (siehe Schema 3.10). Coulomb et al. (1996) zeigten, dass sich bei einem Pilzbefall die Peroxisomen wie Schlachtschiffe vor der Membran aufreihen. Zusammen mit dem Befund dieser Arbeit, dass bei einer Infektion die Photorespiration gesteigert wird (und diese damit den oben genannten Weg mit der Erzeugung von ROS stark fördert), ist dies ein starker Hinweis auf den Einsatz der Peroxisomen bei der Pathogenabwehr.

Die Abbildung 14.9 ist hierzu kein Widerspruch, da aufgrund der räumlichen Nähe der Chloroplasten und Peroxisomen keine Trennung im Bild möglich ist.

Der Photorespirationsweg funktioniert natürlich auch nur bei Licht, aber die Peroxisomen können auch mit anderen Quellen ROS produzieren, z. B. über den Xanthin-Stoffwechsel (Del Río et al., 1998), so dass dies auch im Dunkeln laufen könnte.

## 18.5 Ausgangspunkt und Ansätze zur Fortführung und Vertiefung

Die vorliegende Arbeit war im Hinblick auf die Aufgabenstellung des DFG-Projektes Ha712/16-1,2 so ausgelegt, dass erst einmal mit einem Schrotschuss in der Breite gesucht werden sollte, wo es Signale aus dem photosynthetischen Apparat gibt, die sich für die Pilzerkennung vom Traktor eignen. Damit fehlte an einigen Stellen die Zeit zur Vertiefung, die sicher notwendig gewesen wäre, um die zahlreichen oben beschriebenen Hinweise auf Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung, Photorespiration und ihre Beeinflussung durch den Pilzbefall abzusichern und/oder abzurunden.

Nichtsdestotrotz hat die vorliegende Arbeit einige neue experimentelle Zugänge geschaffen, auf die eine detaillierte Analyse aufbauen kann:

- die Analyse der Rückflanken nach sättigenden Blitzen (Abb. 6.3, 6.6 und 7.2),
- Lichteffekt auf die SHAM-induzierte ROS-Bildung (Abb. 14.16 und 15.2),
- Suche nach dem Kompensationspunkt bei O<sub>2</sub>-und CO<sub>2</sub>-Modulation (Abb. 9.6).

Aus den Frequenzgangmessungen ließ sich nicht die volle Information herausholen, da die Fits keine eindeutigen und vor allem reproduzierbaren Ergebnisse lieferten. Hier wäre die Kombination mit anderen Signalausgängen (Scattering, A820 für den Redox-Zustand von PS I (Klughammer und Schreiber, 1994), photoakustische Gasflussmessungen (Tabrizi et al., 1998) usw.) unbedingt notwendig, um mit diesen die Fits sicherer zu machen.

Zur Zeit wird aber ein ganz anderer Weg gegangen, um mehr Information aus den Tiefen des Stoffwechsels zu bekommen, aus denen nur wenige biophysikalische Signale nach außen dringen: Das sind Gen-Expressionsstudien, die Anne Hoffmann und Anja Hümpel am ZBM begonnen haben. Die vorliegenden Ergebnisse aus dieser Arbeit werden dann zur Überprüfung dienen, ob die aus den Gen-Expressionstudien folgenden physiologischen Aussagen auch zutreffen. Eine weitere Vertiefung der Ansätze dieser Arbeit wird dort ihre Schwerpunkte legen, wo die Expressionsstudien besonders markante Effekte erwarten lassen.

Für eine mögliche Online-Pilzdetektion vom fahrenden Traktor würde sich der oben genannte Weg der umgebauten Algenerkennungsanlage anbieten, da diese Signale sich zum einen leicht messen lassen und zum anderen die Hoffnung bringen, eine funktionierende Erkennung leisten zu können. Ob die hier gezeigten Unterschiede allerdings pilztypisch genug sind, kann nur mit neuen umfangreichen Versuchsreihen überprüft werden.

# Kapitel 19

## Zusammenfassung

Die Ziele dieser Arbeit entspringen zum einen einer technischen Aufgabenstellung, nämlich der Suche nach einem Verfahren, das über die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz die Erkennung von Pilzbefall vom fahrenden Traktor aus ermöglichen soll, zum anderen einem Themengebiet der Grundlagenforschung, nämlich der Analyse der Auswirkung einer Pilzinfektion auf das photosynthetische System in Pflanzen, insbesondere auf die Wechselwirkung zwischen Chloroplasten, Peroxisomen und Mitochondrien.

Es kamen die folgenden Methoden bei gesunden und infizierten Blättern zum Einsatz:

- Bestimmung des photochemischen und photothermischen Flusses durch Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz mit sättigenden Blitzen und Inhibitoren,
- Analyse der Rückstellflanken nach sättigenden Blitzen unter Einsatz von Inhibitoren,
- Messung der Änderung der Exzitonen-Flüsse unter Fernrot-Licht und der Reaktion auf Fernrot-Blitze,
- Messung der Kompensation der Einflüsse von sinusförmig modulierter  $\text{CO}_2$ - und  $\text{O}_2$ -Konzentrationen auf die Exzitonen-Flüsse,
- Erfassung der Änderung der photochemischen und photothermischen Flüsse, der Thylakoid-Energetisierung und der Bildung von Zeaxanthin auf Sprünge in der Lichtintensität, der  $\text{CO}_2$ - und  $\text{O}_2$ -Konzentration,
- Bestimmung der Offenflächen der Stomata sowie der Netto-Photosyntheserate und Transpiration,
- Einfluss des Windes auf die  $\text{CO}_2$ -Konzentration über den Spaltöffnungen,
- Messung von Frequenzgängen im FC-Signal auf sinusförmig modulierte  $\text{CO}_2$ - und  $\text{O}_2$ -Konzentrationen,
- Analyse der zeitlichen und räumlichen Bildung von reaktivem Sauerstoff (ROS) mit verschiedenen Stoffwechselgiften und Beleuchtungsstärken,
- Bestimmung des Zeaxanthin-Gehaltes mittels HPLC,
- Messung von Fluoreszenz-Spektren.

**Pilzerkennung vom fahrenden Traktor:** Es wurde eine schwache Absenkung des photochemischen Flusses nach Beleuchtung bei infizierten Blättern gefunden. Die Thermik zeigt mit zusätzlichem FR-Licht bei Pilzinfektion einen etwas stärkeren Effekt. Auch beim Ausschalt-sprung des Fernrot-Lichtes ergaben sich signifikante Änderungen durch den Befall. Als weiterer Messzugang, der allerdings nicht sehr deutliche Unterschiede zwischen befallenen und gesunden Blättern lieferte, wurde die Analyse der Blitzrückstellflanke nach einem sättigenden Blitz entwickelt.

Alle zur Infektionserkennung betrachteten Messgrößen leiden unter einer starken Variabilität, die wahrscheinlich vom Infektionstag, aber auch von der Wachstumsphase der Blätter abhängt. Die Existenz dieser Variabilität konnte auch an Signalen festgestellt werden, die sich zwar nicht zur Messung vom Traktor aus eignen, aber das Problem mangelnder Konstanz deutlich herausstellen. Dies gilt für die Wirkung von Gaskonzentrationsänderungen, für Absorptionsmessungen im 505- und 535-nm-Bereich (Membran-Energetisierung und Zeaxanthin-Bildung), für die Öffnung der Stomata und für die stomatäre Leitfähigkeit.

Bei Messungen im April 2003 änderte sich der photochemische Fluss bei gesunden Blättern bei einer CO<sub>2</sub>-Erniedrigung nicht, weil er vollständig von anderen Akzeptoren übernommen wurde. Diese Übernahme wird dadurch sichtbar, dass die neuen Wege einen anderen ATP-Bedarf haben, der sich in der Steigerung der thermischen Flusskomponente bemerkbar macht. Infizierte Blätter haben diese Kompensation nicht, hier fällt der Fluss. Bei einer späteren Messserie im Juni/Juli 2004 dagegen verhielten sich die gesunden wie die infizierten Blätter.

Auch von anderer Seite zeigt sich diese mangelnde Konstanz: Die Empfindlichkeit der Bildung von ROS auf die Gabe des Inhibitors SHAM ist im Juni/Juli 2004 deutlich geringer als bei den anderen Messungen. Die AOX scheint hier also weniger Redox-Äquivalente zu übernehmen, weil die mitochondriale Aktivität wohl reduziert ist und weniger Export aus den Chloroplasten stattfindet, was zu der erwähnten fehlenden Kompensation bei den CO<sub>2</sub>-Sprüngen passt.

Ein solches jahreszeitliches Verhalten zeigt auch die Wirkung der Lichtsprünge und der Erniedrigung der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf die Membran-Energetisierung: Im August/September zeigen infizierte Blätter im Gegensatz zu gesunden eine geringere Zunahme der Energetisierung, da weniger Export stattfindet (kleinere mitochondriale Aktivität). Dieser Unterschied verschwindet hingegen bei der Messserie im Juni/Juli, bei der generell die Empfindlichkeit für SHAM und damit auch der Export herabgesetzt war.

Dass es sich bei diesen jahreszeitlich bedingten Änderungen nicht nur um mehr oder weniger zufällige Schwankungen handelt, zeigt die Messung der Antwort auf eine CO<sub>2</sub>-Erniedrigung im Zeitraum von April 2003 bis August 2004: Diese ist fast sinusförmig.

Ein weiteres Problem für die Pilzerkennung ergibt sich aus einer Abhängigkeit von der Infektionsdauer: Die Wirkung von SHAM auf die photochemischen Flüsse zeigt ein entgegengesetztes Verhalten an den Tagen 1–7 und 8–25 nach Infektion. Auch die Messungen mit FR-Licht verhalten sich bei verschiedenen Infektionszeiten anders. Bei den Messungen im Zusammenhang mit der mitochondrialen Aktivität bzw. mit dem Export (gemessen über die SHAM-Empfindlichkeit) zeigte sich eine zusätzliche kürzere Abhängigkeit: Am ersten und zweiten Tag nach Infektion sind Änderungen deutlich, am dritten Tag verhalten sich die Blätter schon fast wieder wie gesunde.

Die Chlorophyll-Fluoreszenz scheint sich also nicht für die Pathogenerkennung auf dem Feld zu eignen, da die durch den Pilz verursachten Veränderungen im Stoffwechsel sich nicht in signifikanten Signalen äußern.

Allerdings tat sich in der vorliegenden Arbeit doch noch eine Möglichkeit für die Pilzdetektion vom fahrenden Traktor auf: Spektrale Untersuchungen im Bereich 470 und 430 nm ergeben deutliche Unterschiede zwischen infizierten und gesunden Pflanzen.

**Die Elektronenfluss-Verzweigung hinter PS I** war ein weiterer wichtiger Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit, da sich gezeigt hatte, dass PS-I-Akzeptoren sich bei Pilzbefall ändern. Dabei ergaben sich folgende messtechnische Zugänge:

Die Messung der CO<sub>2</sub>- und O<sub>2</sub>-Frequenzgänge zeigte unterschiedliche Verläufe, was darauf hindeutet, dass weitere Akzeptoren außer Carboxylierung und Oxygenierung beteiligt sind. Die Versuche zur Kompensation von O<sub>2</sub>- und gegenläufiger CO<sub>2</sub>-Modulation zeigten dies noch deutlicher. Dieser Befund findet weitere Unterstützung durch die Frequenzgangmessungen mit Inhibitoren, wo es unter Low-Light zu Veränderungen in der Kurvenform (Kerbe, hochfrequenter Buckel bei O<sub>2</sub>-Modulation, 180°-Phasendrehung) kam.

Um welche zusätzlichen Akzeptoren es sich handeln könnte, wird im Folgenden untersucht:

- *Photorespiration*: Bei den Frequenzgängen ist unter Inhibitoreinwirkung die Modulationswirkung von CO<sub>2</sub> erniedrigt und die von O<sub>2</sub> erhöht, was als Hinweis für die Photorespiration genommen wird. Da bei der Photorespiration O<sub>2</sub> an der gleichen Stelle (RubisCO) angreift wie CO<sub>2</sub>, würde ein solches Umschalten nicht die Form der Frequenzgänge ändern. Dies entspricht der Beobachtung. Eine sprunghafte Erniedrigung der O<sub>2</sub>-Konzentration äußert sich in einer Erhöhung des thermischen Flusses, was durch eine verstärkte Photorespiration ebenso erklärt werden kann wie die Befunde des Schließens der Stomata bei Pilzinfektion und der höheren Empfindlichkeit der O<sub>2</sub>-Gassprünge gegenüber denen bei CO<sub>2</sub>.
- *Mehler-Reaktion*: Bei den Messungen der O<sub>2</sub>-Frequenzgänge tritt unter Glyceraldehyd und Low-Light im Hochfrequenten ein Buckel in der Kurve auf. Der einzige O<sub>2</sub>-verbrauchende PS-I-Akzeptor, der genügend schnell ist, könnte die Mehler-Reaktion sein.
- *Mitochondrien*: Im obigen Abschnitt über die Möglichkeiten der Pathogendetektion vom Traktor aus sind bereits aus den Messungen Hinweise auf die Kopplung der Chloroplasten und Mitochondrien gezeigt worden im Zusammenhang mit der Empfindlichkeit auf die Gabe von SHAM und dem Umschalten der Elektronenflüsse bei Senkung des CO<sub>2</sub>-Gehaltes.

Die Korrelation zwischen der SHAM-Empfindlichkeit der ROS-Bildung und der Art der Fluss-Umschaltung während der jahreszeitlichen Schwankungen ist ein weiterer Beleg, dass die Prozesse in den Chloroplasten und den Mitochondrien gekoppelt sind.

Auch bei den Messungen der Blitzrückstellflanken ergaben sich deutliche Hinweise auf eine solche Kopplung: Oligomycin und SHAM (beides mitochondriale Inhibitoren) wirken auf diese Flanken, was nur über einen Export aus den Chloroplasten in die Mitochondrien erklärt werden kann.

Der Abfall der Thermik und der Anstieg des photochemischen Flusses unter SHAM zeigen, dass hier eine mitochondriale Senke mit geringem ATP-Verbrauch durch eine neue Senke mit höherem ATP-Verbrauch ersetzt wird.

Ferner wurde gezeigt, dass ROS-anzeigende DCF-Fluoreszenz unter SHAM in der Dunkelheit einen Anstieg zeigt, unter Licht dann aber einen Abfall. Dies wird so erklärt, dass die ROS-Produktion in den Mitochondrien durch die Inhibition der AOX gesteigert wird. Im Licht führt in jedem Fall aus den Chloroplasten exportiertes NAD(P)H zu einer Reduktion der Fluoreszenz, und das ist ein Hinweis auf einen Export.

- *Zyklischer Transport um PS I*: Bei den Messungen der Blitzrückstellflanken nach sättigenden Blitzen ist die Entladung unter Antimycin beschleunigt. Dies wird durch den Wegfall des zyklischen Transportes um PS I erklärt, welcher sonst durch den Transport von Elektronen zurück zum PQ-Pool die Entladung bremst.

**Wirkung der Pilzinfektion auf die Umschaltung der PS-I-Akzeptoren:** Interessant sind die obigen Ergebnisse auch im Hinblick auf die Veränderung der PS-I-Akzeptoren nach Pilzinfektion.

Es wurde gezeigt, dass gesunde Pflanzen im Gegensatz zu infizierten auf eine Reduktion der CO<sub>2</sub>-Konzentration und damit auf den Wegfall der Akzeptoren im Calvin-Zyklus nicht mit einer Senkung des photochemischen Flusses reagieren. Die infizierten Blätter scheinen demnach nicht auf andere Akzeptoren umschalten zu können. Dies zeigt sich ebenfalls in der Messung der Membran-Energetisierung, welche bei dem CO<sub>2</sub>-Sprung bei gesunden Blättern stärker wächst, weil diese andere Akzeptoren mit einer geänderten ATP/Fluss-Bilanz benutzen können. Auch der erwähnte Jahresgang in der Empfindlichkeit auf die Wirkung von SHAM bei der ROS-Bildung in den Mitochondrien und der damit gekoppelten unterschiedlichen Membran-Energetisierung bei Licht- und CO<sub>2</sub>-Sprüngen unterstützt die These der Wirkung der Infektion auf diese Kopplung.

Bei der Messung der Blitzrückstellflanken nach sättigenden Blitzen war unter Low-Light bei infizierten Blättern der bei den gesunden Blättern deutliche Effekt von Oligomycin schwächer und unter High-Light ganz verschwunden. Also scheint hier der Pilz die Chloroplasten-Mitochondrien-Kopplung aufzuheben. Auch die Frequenzgang-Messungen zeigen dies, weil hier unter SHAM die Modulation durch O<sub>2</sub> steigt und die durch CO<sub>2</sub> sinkt. Dies kann ein Hinweis auf Photorespiration sein, welche durch die Wirkung des Inhibitors gestärkt wird, da der Export an die Mitochondrien wegfällt.

Bei der Messung der Öffnungen der Stomata fand sich eine Verringerung der Oberflächen unter Pilzinfektion ebenso wie das Absinken der Netto-Photosynthese-Rate. Dieser Befund unterstützt die Hypothese der Stimulation der Photorespiration bei Pilzinfektion.

Die Bestimmung der ROS-Erzeugung ergab bei infizierten Blättern eine herabgesetzte Aktivität der Mitochondrien, damit wären diese auch gar nicht in der Lage, aus den Chloroplasten exportierte Redox-Äquivalente aufzunehmen.

**Mechanismen der ROS-Erzeugung zur Pilzabwehr:** Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop zeigten bei pilzinfizierten Pflanzen ROS-Entwicklungen, die mit der räumlichen Lage der Chloroplasten zusammenfielen. Allerdings lassen diese Aufnahmen keinen endgültigen Schluss zu, da die kleinen Peroxisomen und Mitochondrien direkt auf der Oberfläche der im Vergleich dazu riesigen Chloroplasten sitzen können. Die Auflösung der Aufnahmen reicht nicht aus, das zu trennen. Für chloroplastäre ROS-Erzeugung sprechen die Hinweise auf das oben diskutierte Einschalten der Mehler-Reaktion. ROS-Erzeugung in den Peroxisomen entstünde bei der Photorespiration. Beides sind Kandidaten für Prozesse, die bei Pilzinfektion eingeschaltet werden. Aus dem Vergleich der Messungen unter SHAM bei infizierten und gesunden Blättern ergab sich, dass die Mitochondrien wohl keinen großen Beitrag zur Pathogenabwehr mittels reaktivem Sauerstoff leisten. So ist anzunehmen, dass eine erhöhte Photorespiration, die zusammen mit den Peroxisomen zu einer verstärkten Freisetzung von ROS führen kann, die Hauptquelle für dieses ROS ist.

#### **Kernaussagen:**

- Die Pathogenerkennung vom fahrenden Traktor mit Hilfe der Chlorophyll-Fluoreszenz erscheint nicht machbar. Es ergibt sich jedoch die Möglichkeit, mit der Messung entsprechender Spektren eine Pilzdetektion erfolgreich durchführen zu können.
- Es zeigten sich deutliche Hinweise auf eine Kopplung der Chloroplasten und der Mitochondrien.
- Unter Pilzbefall scheint der Export an die Mitochondrien stark heruntergefahren zu sein und dafür die Photorespiration gestärkt.
- Die Quelle von reaktivem Sauerstoff zur Pilzabwehr findet sich vermutlich über den Photorespirationsweg in den Peroxisomen.

## Anhang A

# Bezugsquellen

### A.1 Chemikalien

- Antimycin A: Bestell-Nr. A8674 bei Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen bei München, Fax 089 / 65 13 - 11 69
- Dichlorofluorescein-Diacetate (DCF-DA): Bestell-Nr. D6883 bei Sigma-Aldrich
- Diaminobenzidine (DAB): Bestell-Nr. D8001 bei Sigma-Aldrich
- Glyceraldehyd: Produkt-Nummer: G5001 von Sigma-Aldrich
- Nitroblue Tetrazolium (NBT): Produkt-Nummer: 06428-2 bei Biomol GmbH, Waidmannstr. 35, 22769 Hamburg, Fax: +49-40 - 85 32 60-22
- Oligomycin: Produkt-Nummer: O4876 bei Sigma-Aldrich
- Salicylhydroxamic acid (SHAM): Produkt-Nummer: S607 bei Sigma-Aldrich
- Trichloressigsäure (TCA): Bestell-Nr. 3744.2 bei Carl Roth GmbH & Co. KG, Schoemperlenstr. 1-5, 76185 Karlsruhe, Fax: 0721/5606-149
- Trichlormethan/Chloroform: Bestell-Nr. 3313.1 bei Roth

### A.2 Geräte

- LEDs in grün (Typ NSPG500S), blaugrün (Typ NSPE500S) und blau (Typ NSPB500S): Nichia Chemical Europe GmbH, Südwestpark 60, 90449 Nürnberg (ab 100 Stück); kleinere Mengen über den „E-Shop“ auf [www.nichia.de](http://www.nichia.de)
- Schmalbandige Filter: AHF Analysentechnik AG, Postfach 1543, 72005 Tübingen
- DT-Cyan Wärmeschutzfilter: Heinz Walz GmbH, Eichenring 6, 91090 Effeltrich
- Glasfilter von Schott und schmalbandige Filter: ITOS, Carl-Zeiss-Straße 23, 55129 Mainz
- Tylan-Gasflussregler: Mykrolis GmbH, Kirchhoffstraße 8, 85386 Eching

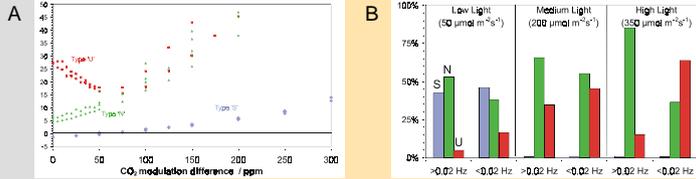


# Influence of fungal infection on photosynthesis and ROS generation

Hammes<sup>1</sup>, E., Hoffmann<sup>1</sup>, A., Desel<sup>2</sup>, C., Plieth<sup>1</sup>, C., Schieder<sup>3</sup>, F., Verreet<sup>3</sup>, J.A., Hansen<sup>1</sup>, U.P.

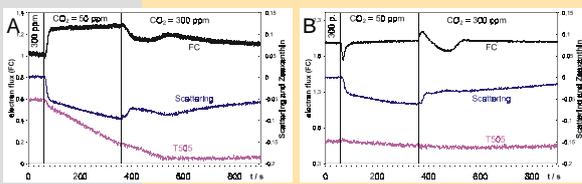
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, <sup>1</sup>Zentrum f. Biochemie und Molekularbiologie, <sup>2</sup>Botanisches Institut, Am Botanischen Garten 1-9, <sup>3</sup>Institut für Phytopathologie, Hermann-Rodewaldstr.9, D-24118 Kiel

## Leaves can utilize different acceptors for photosynthetic electron transport

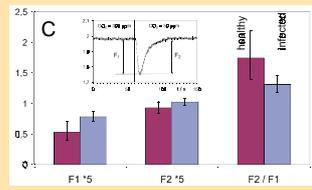


**Fig. 1.** Demonstration that photosynthetic electron transport utilizes more acceptors than just the Calvin cycle. Gas concentrations were modulated in anti-phase ( $O_2$  from 2% to 8%,  $CO_2$  from 300 ppm to the value given on the x-axis of Fig.1A, frequency = 0.01 Hz). The effect on electron flux was measured by Fluorescence Clamp (FC, Schinner et al. 2001). It is expected that the influences on electron flux cancel each other at a  $CO_2$  modulation of 17.5 ppm, as calculated from the selectivity of Rubisco (blue curve, Fig. 1A, type 'S'). Instead, in many cases an intersection seems to occur at negative concentrations (green, type 'N') or a deflection of the curve (red, type 'U') was found. This shows that at least a third component with a temporal delay relative to Rubisco binding is involved. To demonstrate this, Fig. 1B shows the distributions of occurrence of the three curve types at high and low frequencies of modulation.

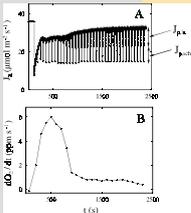
## The involvement of additional acceptors is different in healthy and in infected leaves



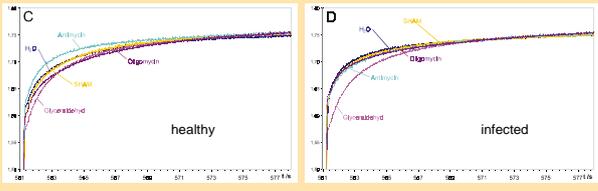
**Fig. 2.** Gas modulation was chosen as a test signal because fungal infection was expected to interfere with the electron acceptors behind PS I. (A) Response of PS II exciton flux (FC), thylakoid energization (Scattering) and Zeaxanthin formation (T505) on the decrease of  $CO_2$  from 300 to 50 ppm for a healthy wheat leaf. Thermal deactivation (energy quenching) is increased with decrease of  $CO_2$  concentration (because ATP consumption by the Calvin cycle decreases), but electron flow (photochemical quenching) continues. This was probed by saturation flashes (not shown). (B) In contrast, wheat infected with *Septoria tritici* shows similar behavior of  $q_e$ , but  $q_p$  is decreased. Obviously, electrons cannot take an alternative route.



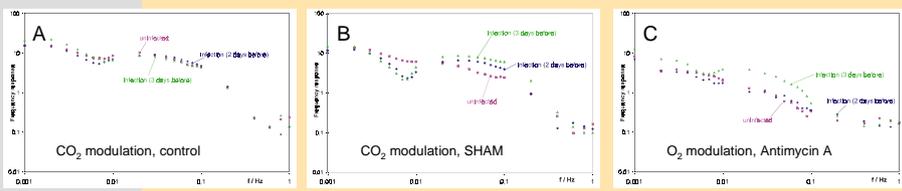
**Fig. 2C.** Averaged data of the FC signal in Fig. 2A and B showing the dependence of upward and downward deflection on infection by means of  $F_2$  and  $F_2/F_1$  as defined in the inset. The ratios  $F_2/F_1$  of healthy and infected wheat leaves support the results of Fig. 2A,B.



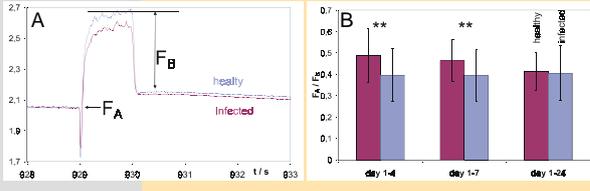
**Fig.3.** The discharge of the PQ-pool after a saturating flash has a slow ( $J_{p,act}$ ) and a fast component ( $J_p$ ). Schinner et al. (2001) showed that during  $CO_2$  deficiency the slow phase becomes stronger (Fig.3A,B) indicating that the slow phase is a measure of the discharge of the PQ pool by remote electron acceptors behind PS I.



**Fig.3 (C,D).** The comparison of Fig. 3C and 3D reveals that the effect of glycerolaldehyd on saturating flashes is stronger in *S. tritici* infected than in uninfected wheat leaves. However, the effect of mitochondrial inhibitors (oligomycin, SHAM) is absent in infected cells. The acceleration of the slow discharge in healthy leaves by antimycin A may be an indication of cyclic transport around PS I which would retard the discharge of the PQ-pool.



**Fig. 4.** Frequency response measurements with modulated  $CO_2$  or  $O_2$  concentrations serve to distinguish kinetically different processes. Fig. 4A shows that healthy and infected cells (two and three days after infection) do not differ much in their kinetic behavior ( $CO_2$  modulation). As in the experiments above, difference become obvious in the presence of inhibitors. This holds for SHAM for the slow components in the range of about 10 min which may be assigned to export from the chloroplasts or enzyme activation. With antimycin A, there were only differences in  $O_2$  modulation.



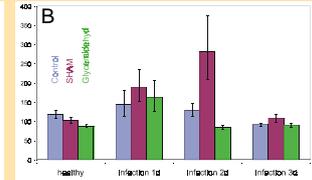
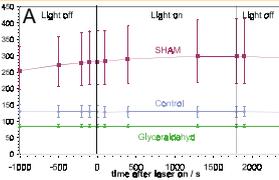
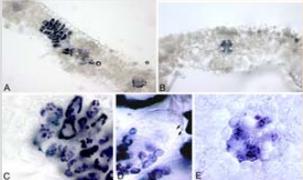
**Fig. 6.** Responses to far-red light gave a stronger indication of infection than those to PSII light (not shown). (A) Response of PSII exciton flow to a pulse of far-red light and definitions of the parameters used in B. (B) The ratio  $F_p/F_B$  showed statistically significant (t-test) differences between healthy and infected leaves during the first 7 days of infection. Averaging over 24 days of infection showed that the effect ceased with time.



**Fig. 9.** Experimental setup

## Relationship between generation of ROS, photosynthesis, and fungal infection

Plants grown on  $NO_3^-$  or  $NH_4^+$  as a sole nitrogen source show different light-induced ROS formation (Zhu et al. 2000; Guo et al. 2004, Poster A. Hoffman et al.) which were related to different electron branching similar to that reported above. There are reports that similar mechanisms may be active in pathogen-infected leaves. However, here no correlation to light was found.



**Fig. 6.** In infected (*S. nodorum*) leaves (A,C,D), ROS (reactive oxygen species) as indicated by NBT is generated in mesophyll cells, whereas it is restricted to the veins in healthy leaves (B,E).

**Fig. 7.** Plants were loaded with the fluorescent ROS-sensitive dye DCF-DA (see poster A. Hoffmann et al.) and ROS formation in a leaf disc was monitored in the dark and in the light ( $500\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ ). (A) There was no obvious effect of illumination on ROS generation as shown for a leaf at the 2<sup>nd</sup> day of infection. (B) ROS formation was slightly increased at the first day of infection. At the second day, a strong stimulation by SHAM (inhibitor of the mitochondrial AOX or stimulator of plasmalemma NADH-oxidase as known from roots (Sukalovic & Vuletic 2003)) occurred as also shown in (A). At the third day, ROS formation levelled off.

**Conclusion:** Differences of photosynthetic signals between healthy and infected leaves become obvious only if PS I acceptors are affected by gas concentration or by inhibitors. The response to actinic light only shows a small decrease in photochemical quenching, even though a better signal is obtained with far-red light. This renders the detection of fungal infections by monitoring chlorophyll fluorescence e.g. from a moving tractor nearly impossible. In contrast to  $NH_4^+$ -grown plants, ROS production in infected leaves does not seem to be related to photosynthetic activity (as may be useful in order to fight pathogens also in the dark). The effect of SHAM may indicate an involvement of the mitochondrial alternative oxidase (AOX).

**References**  
 Guo S, Schinner K, Sattelmacher B, Hansen UP. 2004. Different Apparent  $CO_2$  Compensation Points in Nitrate- and Ammonium-grown *Phaseolus vulgaris* L. and its relationship to non-photosynthetic  $CO_2$  evolution. *Physiol Plant*, (submitted).  
 Schinner K, Giamnicolis I, Hansen UP. 2001. Fluorescence clamp: a new approach of measuring fluxes into and out of the antenna pool of PS II. *Photosynth. Res.* 66: 109-123.  
 Sukalovic VHT, Vuletic M. 2003. The characterization of peroxidases in mitochondria from maize roots. *Plant Sci* 164: 999-1007.  
 Zhu Z, Gerezales J, Bendoren R, Schinner K, Tabriz H, Sattelmacher B, Hansen U.P. 2000. Different tolerance to light stress in  $NO_3^-$ - and  $NH_4^+$ -grown *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Biol.* 2: 558-570



# ROS production in leaves of *A. thaliana* as affected by different nitrogen sources

A. Hoffmann, C. Plieth, C. Desel, S. Milde, A. Hümpel, E. Hammes, B. Sattelmacher, U.P. Hansen

Center of biochemistry and Molecular Biology, Institute of Botany, University of Kiel, Am Botanischen Garten 1-9, D 24098 Kiel, Germany



### Abstract

*Phaseolus vulgaris* showed higher production of reactive oxygen species (ROS) in  $\text{NH}_4^+$ -grown plants than in  $\text{NO}_3^-$ -grown plants. The ROS-sensitive dyes nitroblue tetrazolium (NBT) and dichlorofluorescein-diacetate (DCF-DA) revealed a more complicated situation in *Arabidopsis thaliana*. Under light stress, plants grown on  $\text{NH}_4^+$ -agar and infiltrated with the dyes indicated lower ROS-formation than  $\text{NO}_3^-$ -grown ones did. This, however, seemed to be caused by  $\text{CO}_2$  deficiency since embedding the DCF-infiltrated plants in 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  decreased the signal from  $\text{NO}_3^-$ - and increases that from  $\text{NH}_4^+$ -plants. This resulted in a situation similar to that in *Phaseolus vulgaris* and was consistent with measurements of chlorophyll-fluorescence (PAM). Furthermore, the supplementation with  $\text{CO}_2$  seemed to interfere with background ROS production in  $\text{NH}_4^+$ -plants. Now, also the leave area not exposed to the actinic light were highly fluorescent. As all physiological studies suffer from this kind of ambiguity a genetic approach was based on microarray technology and Northern blot analysis. The physiological results are discussed in the light of the finding that nitrate reductase (NR) of  $\text{NO}_3^-$ -grown plants is down regulated and sucrose phosphate synthase (SPS) is upregulated upon illumination.

### Growth response

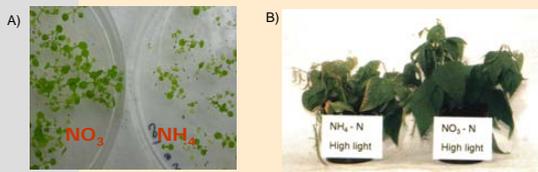


Fig.1 It was found that plant growth is retarded in (B)  $\text{NH}_4^+$ -grown *Phaseolus vulgaris* as compared to  $\text{NO}_3^-$ -grown *Phaseolus vulgaris*, Zhu et al. (1999). (A) This also occurs in *Arabidopsis thaliana*. In the case of *P. vulgaris*, a hypothesis (Fig. 2) was created which explains the light-induced damage in terms of different acceptors for photosynthetic electron flow and the related generation of reactive oxygen species (ROS).

### Metabolic pathways

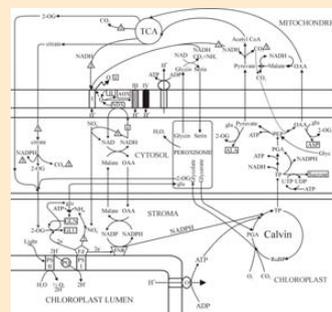


Fig. 2. Metabolic pathways responsible for N-form-dependent lipid peroxidation, Induction of scavenging enzymes, change in  $\text{CO}_2$  compensation point. Modified (Guo et al. 2004) scheme of Noctor and Foyer (1998)

### Physiological investigation

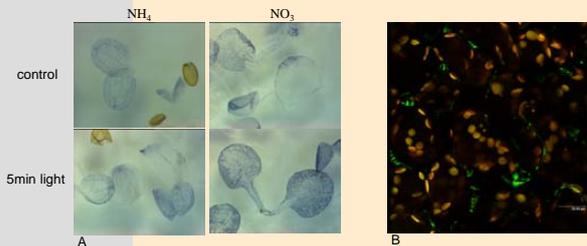


Fig.3 Surprisingly, ROS production as measured by NBT was higher in (A, microscope 16x)  $\text{NO}_3^-$ -grown *A. thaliana* plants rather than in  $\text{NH}_4^+$ -grown plants. The origin of this ROS seems to be in the chloroplasts as indicated by an overlay (B, yellow, confocal microscopy) of chlorophyll-fluorescence (red) and DCF-fluorescence (green).

### Gene expression studies



Fig.6 Microarray on glassslide hybridized with Cy3/Cy5-labelled cDNA

### Experimental design:

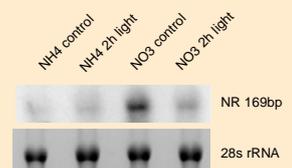
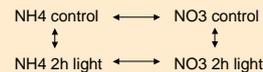


Fig.7 Northern Blot showing light-induced downregulation of NR in  $\text{NO}_3^-$ -grown *A. thaliana*.

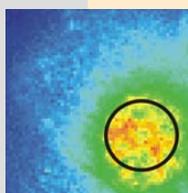
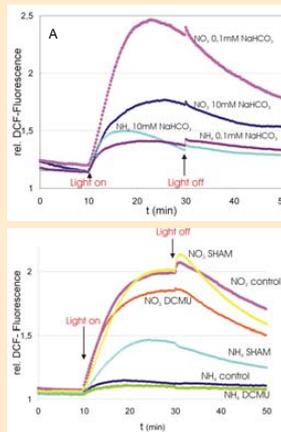


Fig.4 Temporal behaviour of ROS-production in leaves of *A. thaliana* was studied by illuminating the leaf by a light conductor (9000  $\mu\text{E}$ , black ring, diameter = 125 $\mu\text{m}$ ) and measuring DCF fluorescence in the area marked by the ring and normalized by the fluorescence outside the ring (blue field)

Fig.5 Different scenarios of ROS-production. (A) light-induced (t = 10 to 30 min) ROS-production is much higher in  $\text{NO}_3^-$ -grown leaves. It was reduced by supplementing the leaves with a  $\text{CO}_2$  source. In contrast, light-induced ROS production in  $\text{NH}_4^+$ -grown leaves was not affected or even increased under high bicarbonate (B) Light-induced ROS-production in  $\text{NH}_4^+$ -grown leaves was sensitive to SHAM, the inhibitor of the mitochondrial AOX (and of chlororespiration).



References  
Guo, S., Schirmer, K., Sattelmacher, B., Hansen, U.P. 2004. Physiol. Plant. (submitted)  
Noctor, G., Foyer, C.H. 1998. J. Exp. Bot. 49: 1989-1998  
Zhu, Z., Gerendas, J., Bendixen, R., Schirmer, K., Tabrizi, H., Sattelmacher, B., Hansen, U.P. 2000. Plant Biol. 2: 558-570

### Results and Conclusion

The results from *A.thaliana* seem to contradict those from *P.vulgaris*.

However, a key may be found in the following aspects:

- a. The leaves of *A.thaliana* were very young (2-weeks old, in order to avoid interference from senescence-induced ROS)
- b. In  $\text{NO}_3^-$ -grown leaves of *A.thaliana* upon light
  - nitrate reductase (NR) was downregulated (>2x)
  - sucrose phosphate synthase (SPS) was upregulated (>2x)

This provides a working hypothesis of how these effects can be generated by the metabolic pathways in Fig.2:

Assume that Fig.2 also holds for *A.thaliana*:

→  $\text{NO}_3^-$ -grown leaves export redox equivalents to N-assimilation and  $\text{NH}_4^+$ -grown leaves to the mitochondria

→ NR is slowed down in young leaves in the light:

1.  $\text{NO}_3^-$ -grown plants may have problems to get rid of superfluous redox equivalents and ROS production occurs in the chloroplasts (Fig.3)
2.  $\text{NH}_4^+$ -grown plants may still have the chance to use the mitochondrial acceptors (Fig.2) which are not deactivated with down regulation of NR resulting in lower ROS production.

Why is NR downregulated in young leaves of *A.thaliana*?

The young still growing leaves of *A.thaliana* may prefer the generation of biomass over protein synthesis in the light (indicated by upregulation of SPS).

Nevertheless, the fact that *A.thaliana* behaves different from *P.vulgaris* is still an open question and may lead to the detection of new mechanisms.



## Literaturverzeichnis

- Affourtit, C., Krab, K. und Moore, A. (2001) Control of plant mitochondrial respiration (Review). *Biochimica et Biophysica Acta* 1504: 58–69.
- Agrawal, G. K., Randeep, R., Jwa-Nam, S., Agrawal, V. P., Rakwal, R. und Jwa, N. S. (2002) Effects of signaling molecules, protein phosphatase inhibitors and blast pathogen (*Magnaporthe grisea*) on the mRNA level of a rice (*Oryza sativa* L.) phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (OsPHGPX) gene in seedling leaves. *Gene* 283: 227–236.
- Albertsen, A. und Hansen, U. P. (1994) Estimation of kinetic rate constants from multi-channel recordings by a direct fit of the time series. *Biophysical Journal* 67: 1393–1403.
- Anderson, J. V., Chevone, B. I. und Hess, J. L. (1992) Seasonal Variation in the Antioxidant System of Eastern White Pine Needles. *Plant Physiology* 98: 501–508.
- Arai, Y., Nakashita, H., Suzuki, Y., Kobayashi, Y., Shimizu, T., Yasuda, M., Doi, Y. und Yamaguchi, I. (2002) Synthesis of a novel class of polyhydroxyalkanoates in *Arabidopsis* peroxisomes, and their use in monitoring short-chain-length intermediates of  $\beta$ -oxidation. *Plant Cell Physiol* 43: 555–562.
- Backhausen, J., Kitzmann, C., Horton, P. und Scheibe, R. (2000) Electron acceptors in isolated spinach chloroplasts act hierarchically to prevent over-reduction and competition for electrons. *Photosynthesis Research* 64: 1–13.
- Backhausen, J., Kitzmann, C. und Scheibe, R. (1994) Competition between electron acceptors in photosynthesis: Regulation of the malate valve during CO<sub>2</sub> fixation and nitrite reduction. *Photosynthesis Research* 42: 75–86.
- Baker, C. J., O'Neill, N. R. und Tomerlin, J. R. (1989) Accumulation of phenolic compounds in incompatible clone/race interactions of *Medicago sativa* and *Colletotrichum trifolii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35: 231–241.
- Baker, C. J., Orlandi, E. W. und Deahl, K. L. (2000) Oxygen metabolism in plant/bacteria interactions: Characterization of the oxygen uptake response of plant suspension cells. *Physiological Molecular Plant Pathology* 57: 159–167.
- Baker, N. und Webber, A. (1987) Interactions between photosystems. *Advances in Botanical Research*. 13: 2–56.
- Ball, J. T. (1987) Calculations related to gas exchange. In Zeiger, E., Farquhar, G. D. und Cowan, J. R., Editoren, *Stomatal Function*, Seiten 445–476. Stanford University Press, Stanford California.
- Baroli, I. und Melis, A. (1996) Photoinhibition and repair in *Dunaliella salina* acclimated to different growth irradiances. *Planta* 198: 640–646.
- Bass, D. A., Parce, J. W., Dechatelet, L. R., Szejda, P., Seeds, M. C. und Thomas, M. (1983) Flow Cytometric Studies of oxidative Product Formation by Neutrophils: A Graded Response to Membrane Stimulation. *Journal of Immunology* 130: 1910–1917.

- Bastiaans, L. (1991) Quantifying the effect of rice leaf blast on leaf photosynthesis, crop growth, and final yield using an ecophysiological model of crop growth. In *Rice blast modeling and forecasting. Selected papers from the International Rice Research Conferences 27-31 Aug. 1990, Seoul*.
- Batandier, C., Fontaine, E., Kériel, C. und Lerverve, X. M. (2002) Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 6: 175–187.
- Batandier, C., Lerverve, X. und Fontaine, E. (2004) Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Induces Reactive Oxygen Species Production at the Level of the Respiratory Chain Complex I. *Journal of Biological Chemistry* 279: 17197–17204.
- Belinky, P. A., Flikshtein, N., Lechenko, S., Gepstein, S. und Dosoretz, C. G. (2003) Reactive oxygen species and induction of lignin peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 6500–6506.
- Bendixen, R., Gerendas, J., Schinner, K., Sattelmacher, B. und Hansen, U. (2001) Difference in zeaxanthin formation in nitrate- and ammonium-grown *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 111: 255–261.
- Bennoun, P. (1994) Chlororespiration revisited: Mitochondrial-plastid interactions in *Chlamydomonas*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1186: 59–66.
- Bennoun, P. (2002) The present model for chlororespiration. *Photosynthesis Research* 73: 273–277.
- Berger, S., Ellersiek, U., Westhoff, P. und Steinmüller, K. (1993) Studies on the expression of NDH-H, a subunit of the NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase of higher-plant chloroplasts. *Planta* 190: 25–31.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A. und Solano, R. (2002) Constitutive expression of Ethylene-Response-Factor1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant Journal* 29: 23–32.
- Beutler, M. (2003) *Spectral fluorescence of chlorophyll and phycobilins as an in-situ tool of phytoplankton analysis - models, algorithms and instruments*. Doktorarbeit, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Beutler, M., Wiltshire, K. H., Arp, M., Kruse, J., Reineke, C., Moldaenke, C. und Hansen, U. P. (2003) A reduced model of the fluorescence from the cyanobacterial photosynthetic apparatus designed for the in situ detection of cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1604: 33–46.
- Beutler, M., Wiltshire, K. H., Meyer, B., Moldaenke, C., Luering, C., Meyerhöfer, M., Hansen, U. P. und Dau, H. (2002) A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*. *Photosynthesis Research* 72: 39–53.
- Beutler, M., Wiltshire, K. H., Reineke, C. und Hansen, U. P. (2004) Algorithms and practical fluorescence models of the photosynthetic apparatus of red cyanobacteria and Cryptophyta designed for the fluorescence detection of red cyanobacteria and cryptophytes. *Aquatic Microbial Ecology* 35: 115–129.
- Bilger, W., Björkman, O. und Thayer, S. (1989) Light-Induced spectral Absorbance Changes in Relation to Photosynthesis and the Epoxidation State of Xanthophyll Cycle Components in Cotton Leaves. *Plant Physiology* 91: 542–551.

- Bilger, W. und Schreiber, U. (1990) Chlorophyll luminescence as an indicator of stress-induced damage to the photosynthetic apparatus. Effects of heat-stress in isolated chloroplasts. *Photosynthesis Research* 25: 161–171.
- Blohm, S. (1994) *Entwicklung und Erprobung eines Meßverfahrens zur Systemanalyse der Chlorophyll-Lumineszenz im Sekunden- und Millisekundenbereich*. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Blunck, R., Kirst, U., Rießner, T. und Hansen, U. P. (1998) How powerful is the dwell-time analysis of multi-channel records? *Journal of Membrane Biology* 165: 19–35.
- Bode, H. W. (1945) *Network Analysis and Feedback Amplifier Design*. Von Norstrand Comp., New York.
- Bolwell, G. P. und Wojtaszek, P. (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51: 347–366.
- Bostock, R. M., Karban, R., Thaler, J. S., Weyman, P. D. und Gilchrist, D. (2001) Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. *European Journal of Plant Pathology* 107: 103–111.
- Bouarab, K., Potin, P., Weinberger, F., Correa, J. und Kloareg, B. (2001) The *Chondrus crispus*-*Acrochaete operculata* host-pathogen association, a novel model in glycobiology and applied phycopathology. *Journal of Applied-Phycology* 13: 185–193.
- Braidot, E., Petrusa, E., Vianello, A. und Macri, F. (1999) Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS Letters* 451: 347–350.
- Brandt, R. und Keston, A. S. (1965) Synthesis of Diacetyldichlorofluorescein: A Stable Reagent for Fluorometric Analysis. *Analytical Biochemistry* 11: 6–9.
- Briantais, J. M., Verrotte, C., Picaud, M. und Krause, G. H. (1979) A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 548: 128–138.
- Brugnoli, E. und Björkmann, O. (1992) Chloroplast movements in leaves: Influence on chlorophyll fluorescence and measurements of light-induced absorbance changes related to  $\Delta\text{pH}$  and zeaxanthin formation. *Photosynthesis Research* 32: 23–35.
- Brüning, B. (1990) *Systemtheoretischer Vergleich der Fluoreszenzantworten des Photosyntheseapparates von Spinatblättern bei Anregung durch Licht und Kohlendioxid*. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Burkitt, M. J. und Wardman, P. (2001) Cytochrome c Is a Potent Catalyst of Dichlorofluorescein Oxidation: Implications for the Role of Reaktive Oxygen Species in Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282: 329–333.
- Cardinale, F., Meskiene, I., Ouaked, F. und Hirt, H. (2002) Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* 14: 703–711.
- Carver, T. L. W., Thomas, B. J., Robbins, M. P. und Zeyen, R. J. (1998) Phenylalanine ammonia-lyase Inhibition, autofluorescence, and localized accumulation of silicon, calcium and manganese in oat epidermis attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* (DC) Speer. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 223–243.

- Carver, T. L. W., Zeyen, R. J., Robbins, M. P. und Dearne, G. A. (1992) Effects of the PAL Inhibitor, AOPP, on oat, barley and wheat cell responses to appropriate and inappropriate formae speciales of *Erysiphe graminis* DC. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 41: 397–409.
- Casano, L. M., Zapata, J. M., Martin, M. und Sabater, B. (2000) Chlororespiration and Poising of Cyclic Electron Transport. *Journal of Biological Chemistry* 275: 942–948.
- Casolo, V., Braidot, E., Chiandussi, E., Macri, F. und Vianello, A. (2000) The role of mild uncoupling, non-coupled respiration in the regulation of hydrogen peroxide generation by plant mitochondria. *FEBS Letters* 474: 53–57.
- Cerovic, Z. G., Morales, F. und Moya, I. (1994) Time-resolved spectral studies of blue-green fluorescence of leaves, mesophyll and chloroplasts of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biochimica et Biophysica Acta* 1188: 58–68.
- Coulomb, C., Polian, C., Lizzi, Y. und Coulomb, P.-J. (1996) Ultrastructural changes concerning the photosynthetic apparatus during *Phytophthora capsici* infection of susceptible and induced pepper leaves. *C.R. Acad. Sci. Science de la vie* 319: 893–899.
- Cournac, L., Josse, E.-M., Joët, T., Rumeau, D., Redding, K., Kuntz, M. und Peltier, G. (2000) Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Biological Sciences* 355: 1447–1454.
- Creelman, R. A. und Mullet, J. E. (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology* 48: 355–381.
- Cruz, C., Lips, S. H. und Martins-Loucao, M. A. (1993) Growth and nutrition of carob plants as affected by nitrogen sources. *Journal of Plant Nutrition* 16: 1–15.
- Danielsson, R., Albertsson, P. A., Mamedov, F. und Styring, S. (2004) Quantification, of photosystem I and II in different parts of the thylakoid membrane from spinach. *Biochimica et Biophysica Acta* 1608: 53–61.
- Dau, H. (1989) *Untersuchung der photosynthetischen Adaptionsmechanismen über die Identifikation kinetischer Komponenten in Chlorophyll-Fluoreszenz und photoakustischen Signalen*. Doktorarbeit, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Dau, H. (1994) Molecular mechanism and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochemistry and Photobiology* 60: 1–23.
- Dau, H. und Canaani, O. (1990) The involvement of LHC phosphorylation in the adaptation of higher plants to changing light intensities and some results on the regulation of LHC 2 phosphorylation in vivo. In Baltscheffsky, M., Editor, *Current Research in Photosynthesis* Band IV Seiten 325–328. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Dau, H. und Canaani, O. (1992) Short-term adaptation of higher plants to changing light intensities and evidence for the involvement of phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex of photosystem II. *Photochemistry and Photobiology* 55: 873–885.
- Dau, H. und Hansen, U.-P. (1988) The involvement of spillover changes in state 1-state 2 transitions in intact leaves at low light intensities. *Biochimica et Biophysica Acta* 934: 156–159.
- Dau, H. und Hansen, U.-P. (1989) Studies on adaption of intact leaves to changing light intensities by a kinetic analysis of chlorophyll-fluorescence and of oxygen-evolution as measured by the photoacoustic signal. *Photosynthesis Research* 20: 59–83.

- Dau, H. und Hansen, U.-P. (1990) A study of the energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence by means of photoacoustic measurements. *Photosynthesis Research* 25: 260–278.
- Dau, H. und Sauer, K. (1996) Exciton equilibration and Photosystem II exciton dynamics - a fluorescence study on Photosystem II membrane particles of spinach. *Biochimica et Biophysica Acta* 1273: 175–190.
- Dau, H., Windecker, R. und Hansen, U. P. (1991) Effect of light-induced changes in thylakoid voltage on chlorophyll fluorescence of *Aegopodium podagraria* leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* 1057: 337–345.
- Day, D., Whelan, J., Millar, A., Siedow, J. und Wiskich, J. (1995) Regulation of the alternative oxidase in plants and fungi. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 497–509.
- De Ackermann, M. D., Stewart, S. und Ibañez, W. (1995) Pathogenic variability of *Septoria tritici* isolates from South America. In Gilchrist, S. L., Editor, *Proc. Septoria tritici Workshop*. Seite 41–50. CIMMYT, Mexico D.F.
- Del Río, L., Pastori, G., Palma, J., Sandalio, L., Sevilla, F., Corpas, F., Jiménez, A. und López-Huertas, E.; Hernández, J. (1998) The Activated Oxygen Role of Peroxisomes in Senescence. *Plant Physiology* 116: 1195–1200.
- Demming-Adams, B. und Adams III, W. W. (1996) The role of the xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1: 21–26.
- Deng, Y., Kohlwein, S. D. und Manella, C. A. (2002) Fasting induces cyanide-resistant respiration and oxidative stress in the amoeba *Chaos carolinensis*: implications for the cubic structural transition in mitochondria. *Protoplasma* 219: 160–167.
- Doke, N. und Miura, Y. (1995) *In vitro* activation of NADPH-dependent  $O_2^-$  generating system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. *Physiological and molecular plant pathology* 46: 17–28.
- Dry, I. B., Dimitriadis, E., Ward, A. D. und Wiskich, J. T. (1987) The photorespiratory hydrogen shuttle. *Biochemical Journal* 245: 667–675.
- Duncan, K. E. und Howard, R. J. (2000) Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Mycological Research* 104: 1074–1082.
- Ehness, R., Ecker, M., Godt-Dietmude, E. und Roitsch, T. (1997) Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell* 9: 1825–1841.
- Eriksen, L. und Munk, L. (2003) The occurrence of *Mycosphaerella graminicola* and its anamorph *Septoria tritici* in winter wheat during the growing season. *European Journal of Plant Pathology* 109: 253–259.
- Eskling, M., Emanuelsson, A. und Åkerlund, H.-E. (2001) Enzymes and Mechanisms for Violaxanthin-Zeaxanthin Conversion. In Aro, E.-M. und Andersson, B., Editoren, *Regulation of Photosynthesis* Seiten 433–452. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Esterbauer, H., Grill, D. und Beck, G. (1975) Studies on Phenols in the Needles of Picea-Abies. *Phyton* 17: 87–100.
- Eyal, Z., Amiri, Z. und Wahl, I. (1973) Physiological specialization of *Septoria tritici*. *Phytopathology* 63: 1087–1091.

- Eyal, Z. und Ziv, O. (1974) The relationship between epidemics of *septoria* leaf blotch and yield losses in spring wheat. *Phytopathology* 64: 1385–1389.
- Feild, T., Nedbal, L. und Ort, D. (1998) Nonphotochemical reduction of the plastoquinon pool in sunflower leaves originates from chlororespiration. *Plant Physiology* 116: 1209–1218.
- Fouche, P. S. (1992) Assessment of crop stress conditions by using low altitude aerial color infrared photography and computer processing. In *Color Aerial Photography in Plant Sciences and Related Fields: Proceedings of the 13th Biennial Workshop. Orlando, Florida* Seiten 18–27, 227–228.
- Gardeström, P. (1996) Interactions between mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1275: 38–40.
- Geacintov, N. E. und Breton, J. (1987) Energy transfer and fluorescence mechanism in photosynthetic membranes. *Critical Reviews in Plant Sciences* 5: 1–44.
- Gebh, D. (1996) *Target-Fit für ein kinetisches Modell des Zeitverhaltens der Chlorophyll-Fluoreszenz*. Doktorarbeit, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Genova, M. L., Ventura, B., Giuliano, G., Bovina, C., Formiggini, G., Parenti-Castelli, G. und Lenaz, G. (2001) The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. *FEBS Letters* 505: 364–368.
- Gillham, D. J. und Dodge, A. D. (1987) Chloroplast Superoxide and Hydrogen Peroxide Scavenging Systems from Pea Leaves: Seasonal variations. *Plant Science* 50: 105–110.
- Gitelson, A. A., Buschmann, C. und Lichtenthaler, H. K. (1998) Leaf chlorophyll fluorescence corrected for reabsorption by means of absorption and reflectance measurements. *Journal of Plant Physiology* 152: 283–296.
- Gitelson, A. A., Merzlyak, M. N. und Lichtenthaler, H. K. (1996) Detection of red edge position and chlorophyll content by reflectance measurements near 700 nm. *Journal of Plant Physiology* 148: 501–508.
- Givan, C. V. (1979) Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry* 375–382: 375–382.
- González-Meler, M., Ribas-Carbo, M., Siedow, J. und Drake, B. (1996) Direct inhibition of plant mitochondrial respiration by elevated CO<sub>2</sub>. *Plant Physiology* 112: 1349–1355.
- Gredilla, R., Sanz, A., Lopes-Torres, M. und Barja, G. (2001) Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I, lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *The FASEB Journal* 15: 1589–1591.
- Guo, S., Schinner, K., Sattelmacher, B. und Hansen, U. P. (2005) Different Apparent CO<sub>2</sub> Compensation Points in Nitrate- and Ammonium-grown *Phaseolus vulgaris* L. and its relationship to non-photorespiratory CO<sub>2</sub> evolution. *Physiologia Plantarum* 123: 288–301.
- Haken, H. und Wolf, H. C. (1987) *Atom- und Quantenphysik*. Springer Verlag, Berlin. 3. Auflage.
- Hammes, E. (2000) *Entwicklung eines Meßaufbaus zum Biomonitoring mit Hilfe von Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen vom Fahrzeug*. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Hammes, E., Hoffmann, A., Plieth, C. und Hansen, U. P. (2005) Light-induced decrease in DCF-fluorescence of leaves of wheat in the presence of SHAM. *Protoplasma* (in press).

- Hanning, I. und Heldt, H. (1993) On the function of mitochondrial metabolism during photosynthesis in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. Partitioning between respiration and export of redox equivalents and precursors for nitrate assimilation products. *Plant Physiology* 103: 1147–1154.
- Hansen, U. P., Dau, H., Brüning, B., Fritsch, T. und Moldaenke, C. (1991) Linear analysis applied to the comparative study of the I-D-P phase chlorophyll fluorescence as induced by actinic PS-II light, PS-I light and changes in CO<sub>2</sub>-concentration. *Photosynthesis Research* 28: 119–130.
- Hansen, U. P., Kolbowski, J. und Dau, H. (1987) Relationship between photosynthesis and plasmalemma transport. *Journal of Experimental Botany* 38: 1965–1981.
- Hansen, U.-P., Moldaenke, C., Tabrizi, H. und 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 Physiology* 34: 681–695.
- Harbinson, J. und Foyer, C. (1991) Relationships between the efficiencies of photosystem I and II and stromal redox state in CO<sub>2</sub>-free air. Evidence for cyclic electron flow in vivo. *Plant Physiology* 97: 41–49.
- Hausladen, A. und Alscher, R. G. (1994) Purification and characterization of glutathione reductase isozymes specific for the state of cold hardiness of red spruce. *Plant Physiology* 205: 205–213.
- Heber, U., Gerst, U., Krieger, A., Neimanis, S. und Kobayashi, Y. (1995) Coupled cyclic electron transport in intact chloroplasts and leaves of C3 plants: does it exist? if so, what is its function? *Photosynthesis Research*. 46: 269–275.
- Heege, H. J., Reusch, S. und Thiessen, E. (2001) Optical Control for Site-Specific Application of Farm Chemicals. In *International Workshop on Spectroscopy Application in Precision Farming, Freising-Weihenstephan, 16.-18. Januar 2001*.
- Heil, M. und Bostock, R. M. (2002) Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defence. *Annals of Botany* 89: 503–512.
- Heldt, H. W. (2003) *Pflanzenbiochemie*. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin dritte Auflage.
- Hintze, R. (1999) *Kinetiken der Chlorophyll-Fluoreszenz: Modellierung der Prozesse und Einsatz als Biomonitor*. Doktorarbeit, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Hoefnagel, M. H. N., Atkin, O. K. und Wiskich, J. T. (1998) Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. Review. *Biochimica et Biophysica Acta* 1366: 235–255.
- Hoefnagel, M. H. N., Millar, A. H., Wiskich, J. T. und Day, D. A. (1995) Cytochrome and Alternative Respiratory Pathways Compete for Electrons in the Presence of Pyruvate in Soybean Mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 318: 394–400.
- Hoffmann, A., Hammes, E., Plieth, C., Desel, C., Sattelmacher, B. und Hansen, U. P. (2005) Effect of CO<sub>2</sub> supply on ROS formation in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* (in press).
- Hormann, H., Neubauer, C., Asada, K. und 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. *Photosynthesis Research* 37: 69–80.

- Hormann, H., Neubauer, C. und Schreiber, U. (1994) An active Mehler-peroxidase reaction sequence can prevent cyclic PS I electron transport in the presence of dioxygen in intact spinach chloroplasts. *Photosynthesis Research* 41: 429–437.
- Horton, P. (1996) Nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence. In Jennings et al., Editor, *Light as an energy source and information carrier in plant physiology*. Seiten 99–111. Plenum Press, New York.
- Horton, P. und Ruban, A. (1993)  $\Delta$ pH-dependent quenching of the F<sub>0</sub> level of chlorophyll fluorescence in spinach leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* 1142: 203–206.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C. und Kogel, K.-H. (1999) Hypersensitive Cell Death and Papilla formation in Barley Attacked by the Powdery Mildew Fungus Are Associated with Hydrogen Peroxide but Not with Salicylic Acid Accumulation. *Plant Physiology* 119: 1251–1260.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Trujillo, M. und Kogel, K.-H. (2000) Barley *Mla* and *Rar* mutants compromised in the hypersensitive cell death response against *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* are modified in their ability to accumulate reactive oxygen intermediates at sites of fungal invasion. *Planta* 212: 16–24.
- Hückelhoven, R. und Kogel, K.-H. (1998) Tissue-Specific Superoxide Generation at Interaction Sites in Resistant and Susceptible Near-Isogenic Barley Lines Attacked by the Powdery Mildew Fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 292–300.
- Hückelhoven, R. und Kogel, K.-H. (2003) Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: Who is who in powdery mildew resistance? *Planta* 216: 891–902.
- Igamberdiev, A., Bykova, N. und Gardestrom, P. (1997a) 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., Hurry, V., Krömer, S. und Gardeström, P. (1998) The role of mitochondrial electron transport during photosynthetic induction. A study with barley (*Hordeum vulgare*) protoplasts incubated with rotenone and oligomycin. *Physiologia Plantarum* 104: 431–439.
- Igamberdiev, A., Zhou-GuoQuing, Malmberg, G. und Gardestrom, P. (1997b) Respiration of barley protoplasts before and after illumination. *Physiologia Plantarum* 99: 15–22.
- Igamberdiev, A. U. und Gardeström, P. (2003) Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* 1606: 117–125.
- Igamberdiev, A. U., Romanowska, E. und Gardeström, P. (2001) Photorespiratory flux and mitochondrial contribution to energy and redox balance of barley leaf protoplasts in the light and during light-dark transitions. *Journal of Plant Physiology* 158: 1325–1332.
- Jakob, B., Gamalei, Y., Wolf, R., Heber, U. und Gross, J. (1997) Photooxidative damage in young leaves of declining grapevine: Does it result from a new and possible viroid-related disease? *Plant Cell Physiology* 38: 1–9.
- Joët, T., Cournac, L., Horvath, E., Medgyesy, P. und Peltier, G. (2001) Increased Sensitivity of Photosynthesis to Antimycin A Induced by Inactivation of the Chloroplast *ndhB* Gene. Evidence for a Participation of the NADH-Dehydrogenase Complex to Cyclic Electron Flow around Photosystem I. *Plant Physiology* 125: 1919–1929.

- Joët, T., Cournac, L., Peltier, G. und Havaux, M. (2002) Cyclic electron flow around photosystem I in C<sub>3</sub> plants. In vivo control by the redox state of chloroplasts and involvement of the NADH-dehydrogenase complex. *Plant Physiology* 128: 760–769.
- Junge, W. (1975) Physical aspects of the electron transport and photophosphorylation in green plants. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 88: 283–301.
- Kaiser, H. (1999) *Die stomatäre Reaktion von Sambucus nigra und Aegopodium podagraria in Abhängigkeit von Licht und Luftfeuchte - In-situ-Beobachtungen und Gaswechsellmessungen im Freiland*. Doktorarbeit, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Kaiser, H. und Kappen, L. (2001) Stomatal oscillations at small apertures: indications for a fundamental insufficiency of stomatal feedback-control inherent in the stomatal turgor mechanism. *Journal of Experimental Botany* 52: 1303–1313.
- Katona, E., Neimanis, S., Schoenknecht, G. und Heber, U. (1992) Photosystem I-dependent cyclic electron transport is important in controlling Photosystem II activity in leaves under conditions of water stress. *Photosynthesis Research* 34: 449–464.
- Kautsky, H. und Hirsch, A. (1931) Neue Versuche zur Kohlenstoffassimilation. *Naturwissenschaften* 19: 964.
- Keen, N. T. (1990) Gene-for-gene complementary in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Genetics* 24: 447–463.
- Kief, M. (1988) *Mikrocomputergesteuerte Aufnahme von Frequenzgängen in biologischen Systemen*. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Klughammer, C. und Schreiber, U. (1994) An improved method, using saturation light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700<sup>+</sup> absorbance changes at 830 nm. *Planta* 192: 261–268.
- Kobayashi, Y. und Heber, U. (1994) Rates of vectorial proton transport supported by cyclic electron flow during oxygen reduction by illuminated intact chloroplasts. *Photosynthesis Research* 41: 419–428.
- Koch, C., Noga, G. und Strittmatter, G. (1994) Photosynthetic electron transport is differentially affected during early stages of cultivar/race-specific interactions between potato and *Phytophthora infestans*. *Planta* 193: 551–557.
- Koch, K. E., Ying-Zeng, Wu-Yong, Avigne, W. T., Ying, Z., Wu, Y. und Paul, M. J. (2000) Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. *Journal of Experimental Botany* 51: 417–427.
- Koch, W., Klein, E. und Walz, H. (1968) Neuartige Gaswechsel-Meßanlage für Pflanzen im Laboratorium und im Freiland. *Siemens Zeitschrift* 42: 392–409.
- Kolbowski, J. und Schreiber, U. (1995) Computer-controlled phytoplankton analyser based on a 4-wavelength PAM Chl fluorometer. In Mathis, P., Editor, *Photosynthesis: From Light to Biosphere* Seiten 825–828. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, London 5. Auflage.
- Krause, G. (1994) The role of oxygen in photoinhibition of photosynthesis. In Foyer, C. und Mullineaux, P. M., Editoren, *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. Seiten 43–76. CRC Press, Boca Raton.

- Krause, G. und Laasch, H. (1987) Photoinhibition of photosynthesis. Studies on mechanism of damage and protection in chloroplasts. In Biggins, J., Editor, *Progress in Photosynthetic Research* Band IV Seiten 19–25. Dordrecht.
- Krause, G. und Weis, E. (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology, II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Research* 5: 139–157.
- Krause, G. H., Verrotte, C. und Briantias, J. M. (1982) Photo-induced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. *Biochimica et Biophysica Acta* 679: 116–124.
- Krömer, S. (1995) Respiration during photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 45–70.
- Krömer, S. und Heldt, H. (1991) On the role of mitochondrial oxidative phosphorylation in photosynthesis metabolism as studied by the effect of oligomycin on photosynthesis in protoplasts and leaves on barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiology* 95: 1270–1276.
- Krupinska, K. (1992) Transcriptional control of plastid gene expression during development of primary foliage leaves of barley grown under a daily light-dark regime. *Planta* 186: 394–303.
- Kushnareva, Y., Murphy, A. N. und Andreyev, A. (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c, NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochemical Journal* 368: 545–553.
- Lambers, H. (1980) The physiological significance of cyanide-resistant respiration in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 3: 293–302.
- Lee, J. und Rudd, J. J. (2002) Calcium-dependent protein kinases: versatile plant signalling components necessary for pathogen defence. *Trends in Plant Science* 7: 97–98.
- Leibl, W., Breton, J., Deprez, J. und Trissl, H. (1989) Photoelectric study on the kinetics of trapping and charge stabilization in oriented PS II membranes. *Photosynthesis Research* 22: 257–275.
- Levall, M. W. und Bornman, J. F. (2000) Differential response of a sensitive and tolerant sugarbeet line to *Cercospora beticola* infection and UV-B radiation. *Physiologia Plantarum* 109: 21–27.
- Libbert, E. (1987) *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Lichtenthaler, H., Gitelson, A. A. und Lang, M. (1996) Non-destructive determination of chlorophyll content of leaves of a green and an aurea mutant of tobacco by reflectance measurements. *Journal of Plant Physiology* 148: 483–493.
- Link, V. L., Hofmann, M. G., Sinha, A. K., Ehness, R., Strnad, M. und Roitsch, T. (2002) Biochemical evidence for the activation of distinct subsets of mitogen-activated protein kinases by voltage and defense-related stimuli. *Plant Physiology* 128: 271–281.
- Loreto, F., Di Marco, G., Tricoli, D. und Sharkey, T. (1994) Measurements of mesophyll conductance, photosynthetic electron transport and alternative electron sinks of field grown wheat leaves. *Photosynthesis Research* 41: 397–403.
- Lüthje, S., Böttger, M. und Döring, O. (2000) Are plants stacked neutrophils? Comparison of pathogen-induced oxidative burst in plants and mammals. *Progress in Botany* 61: 187–222.
- Madrid, E. A., Laxalt, A. M., Beligni, V. und Lamattina, L. (1999) Partial characterization of potato F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase  $\gamma$ -subunit cDNA and its regulation during fungal infection and elicitor treatment. *Physiologia Plantarum* 105: 304–311.

- Manter, D. K., Bond, B. J., Kavanagh, K. L., Rosso, P. H. und Filip, G. M. (2000) Pseudothecia of Swiss needle cast fungus, *Phaeocryptopus gaeumannii*, physically block stomata of Douglas fir, reducing CO<sub>2</sub> assimilation. *New Phytologist* 148: 481–491.
- Manzano, C., Candau, P., Gomez-Moren, C., Relimpio, A. M. und Losada, M. (1976) Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrat and nitrit by particles of *Anacystis nidulans*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 10: 161–169.
- Maxwell, D. P., Nickels, R. und McIntosh, L. (2002) Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant Journal* 29: 269–279.
- Maxwell, D. P., Wang-Yong und McIntosh, L. (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 8271–8276.
- McAinsh, M. R., Ayres, P. G. und Hetherington, A. M. (1990) The effects of brown rust and phosphate on cold acclimation in winter barley. *Ann. Bot.* 66: 101–110.
- Millenaar, F. F. und Lambers, H. (2003) The Alternative Oxidase: *in vivo* Regulation and Funktion. *Plant Biology* 5: 2–15.
- Mitchell, P. (1977) Vectorial chemiosmotic processes. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 996–1005.
- Moller, I. M. und Lin, W. (1986) Membrane-bound NAD(P)H dehydrogenases in higher plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 37: 309–334.
- Moore, A. L. und Siedow, J. N. (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1059: 121–140.
- Moore, S., de Vries, O. M. H. und Tudzynski, P. (2002) The major Cu,Zn SOD of the phytopathogen *Claviceps purpurea* is not essential for pathogenicity. *Molecular Plant Pathology* 3: 9–22.
- Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C. Tomizawa, K.-I., Endo, T., Tasaka, M. und Shikanai, T. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential für photosynthesis. *Nature* 429: 579–582.
- Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M. und Shikanai, T. (2002) *PGR5* Is Involved in Cyclic Electron Flow around Photosystem I and Is Essential for Photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* 110: 361–371.
- Myhre, O., Andersen, M. J., Aarnes, H. und Fonnum, F. (2003) Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology* 65: 1575–1582.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Ishida, J., Nakashima, M., Kamiya, A., Enju, A., Sakurai, T., Satoh, M., Kobayashi, M., Tosa, Y., Park, P. und Shinozaki, K. (2003) The cDNA Microarray Analysis Using an *Arabidopsis pad3* Mutant Reveals the Expression Profiles and Classification of Genes Induced by *Alternaria brassicicola* Attack. *Plant Cell Physiol.* 44: 377–387.
- Nawrath, C., Heck, S., Parinthawong, N., Metraux, J. P. und Nonglak, P. (2002) EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* 14: 275–286.
- Nayak, L., Raval, M. K., Biswal, B. und Biswal, U. C. (2001) Photoprotection of green leaves by zeaxanthin, a two-channel process. *Current Science* 81: 1165–1166.

- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D. und Hancock, J. T. (2002a) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1237–1247.
- Neill, S. J., Desikan, R. und Hancock, J. T. (2002b) Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 388–395.
- Neubauer, C. und Yamamoto, H. Y. (1994) Membrane barriers and Mehler-peroxidase reaction limit the ascorbate available for violaxanthin de-epoxidase activity in intact chloroplasts. *Photosynthesis Research* 39: 137–147.
- Noctor, G. und Foyer, C. (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? *Journal of Experimental Botany* 329(49): 1895–1908.
- Nuernberger, T. und Scheel, D. (2001) Transmission in the plant immune response. *Trends in Plant Science* 6: 372–379.
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J. und Britigan, B. E. (2004) Direct Oxidation of 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein by Pycocyanin and other Redox-active Compounds independent of Reactive Oxygen Species Production. *Free Radical Biology & Medicine* 36: 90–100.
- Osmond, C. B., Daley, P. F., Badger, M. R. und Lüttge, U. (1998) Chlorophyll Fluorescence quenching during photosynthetic induction in leaves of *Abutilon striatum* Dicks. infected with Abutilon mosaic virus, observed with a field-portable imaging system. *Botanica Acta* 111: 390–397.
- Padmasree, K. und Raghavendra, A. (1999a) Importance of oxidative electron transport over oxidative phosphorylation in optimizing photosynthesis in mesophyll protoplasts of pea (*Pisum sativum* L.). *Physiologia Plantarum* 105: 546–553.
- Padmasree, K. und Raghavendra, A. (1999b) Response of photosynthetic carbon assimilation in mesophyll protoplasts to restriction on mitochondrial oxidative metabolism: metabolites related to the redox status and sucrose biosynthesis. *Photosynthesis Research* 62: 231–239.
- Padmasree, K. und Raghavendra, A. S. (2001) Consequence of restricted mitochondrial oxidative metabolism on photosynthetic carbon assimilation in mesophyll protoplasts: Decrease in light activation of four chloroplastic enzymes. *Physiologia Plantarum* 112: 582–588.
- Padmavathi, L. und Raghavendra, A. (2001) Importance of the cytochrome pathway of mitochondrial electron transport over the alternative pathway during the Kok effect in leaf discs of pea (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum* 113: 430–434.
- Pearce, G., Marchand, P. A., Griswold, J., Lewis, N. G. und Ryan, C. A. (1998) Accumulation of Feruloyltyramine and p-Coumaroyltyramine in Tomato Leaves in Response to Wounding. *Phytochemistry* 47: 659–664.
- Peart, J. R., Cook, G., Feys, B. J., Parker, J. E. und Baulcombe, D. C. (2002) An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant Journal* 29: 569–579.
- Peltier, G. und Cournac, L. (2002) Chlororespiration. *Annual Review of Plant Biology* 53: 523–550.
- Pfündel, E. und Bilger, W. (1994) Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynthesis Research* 42: 89–109.

- Plieth, C. und Hansen, U. P. (1992) Light dependence of protoplasmic streaming in *Nitella flexilis* l. as measured by means of laser velocimetry. *Planta* 188: 332–339.
- Plieth, C. und Hansen, U. P. (1996) Methodological aspects of pressure loading of fura-2 into characean cells. *Journal of Experimental Botany* 47: 1601–1612.
- Plieth, C. und Hansen, U. P. (1998) Cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{H}^+$  buffers in green algae a reply protoplasma. *Planta* 203: 210–213.
- Plieth, C., Sattelmacher, B. und Hansen, U. P. (1998) Light-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -transients in green plants II: The effect on the  $\text{K}^+$  channel as studied by a kinetic analysis in *Chara corallina*. *Planta* 207: 52–59.
- Pomar, F., Caballero, N., Pedreño, M. A. und Ros-Barcelo, A. (2002)  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. *FEBS-Letters* 529: 198–202.
- Popov, V. N., Simonian, R. A., Skulachev, V. P. und Starkov, A. A. (1997) Inhibition of the alternative oxidase stimulates  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in plant mitochondria. *FEBS letters* 415: 87–90.
- Porra, J.-R., Thompson, W.-A. und Kriedemann, P.-E. (1989) Determination of Accurate Extinction Coefficients and Simultaneous Equations for assaying Chlorophylls A and B extracted with four different Solvents - Verification of the Concentration of Chlorophyll Standards by Atomic Absorption Spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 975: 384–394.
- Powles, S. und Björkman, O. (1982) Photoinhibition of photosynthesis: effect on chlorophyll-fluorescence at 77 K in intact leaves and in chloroplast membranes of *Nerium oleander*. *Planta* 156: 97–107.
- Prell, H. H. (1996) *Interaktion von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- Purvis, A. (1997) Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 100: 165–170.
- Raggi, V. (1995)  $\text{CO}_2$  assimilation, respiration and chlorophyll fluorescence in peach leaves infected by *Taphrina deformans*. *Physiologia Plantarum* 93: 540–544.
- Ramm, D. (1991) *Messung und Analyse des Chlorophyll-Luminiszenz-Signals in Hinblick auf die Untersuchung der Photosynthese und ihrer Wirkung auf den Membrantransport*. Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Ramm, D. und Hansen, U. P. (1993) Can charge recombination as caused by pH-dependent donor-side limitation in PS2 account for high-energy-state quenching? *Photosynthesis Research* 35: 97–100.
- Razem, F. A. und Bernards, M. A. (2003) Reactive oxygen species production in association with suberization: evidence for an NADPH-dependent oxidase. *Journal of Experimental Botany* 54: 935–941.
- Renger, G., Dohnt, G., Kayed., A., Voss, M. und Gräber, P. (1987) Die Chlorophyll-a-Fluoreszenz als Indikator des Funktionszustandes des Photosyntheseapparates in Pflanzen. Theoretische Grundlagen und praktische Anwendung. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 29: 1–24.
- Reumann, S., Heupel, R. und Heldt, H. (1994) Compartmentation studies on spinach leaf peroxisomes. II. Evidence for the transfer of reductant from the cytosol to the peroxisomal compartment via a malate shuttle. *Planta* 193: 167–173.

- Ribas-Carbo, M., Berry, J., Yakir, D., Giles, L., Robinson, S., Lennon, A. und Siedow, J. (1995) Electron Partitioning between the Cytochrome and Alternative Pathways in Plant Mitochondria. *Plant Physiology* 109: 829–837.
- Robard, A. W. und Lucas, W. J. (1990) Plasmodesmata. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 375–414.
- Rogers, M. A. und Bates, A. L. (1980) Kinetic and spectroscopic features of some carotenoid triplet states: sensitization by singlet oxygen. *Photochemistry and Photobiology* 890: 23–31.
- Rolke, Y., Liu, S., Quidde, T., Williamson, B., A., S., Weltring, K. M., Siewers, V., Tenberge, K. B., Tudzynski, B. und Tudzynski, P. (2004) Functional analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology* 5: 17–23.
- Ros-Barceló, A. (1995) Peroxidase and not laccase is the enzyme responsible for cell wall lignification in the secondary thickening of xylem vessels in *Lupinus*. *Protoplasma* 186: 41–44.
- Ros-Barceló, A., Pomar, F., López-Serrano, M., Martínez, P. und Pedreño, M. A. (2002) Developmental regulation of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 325–332.
- Rosenkranz, A. R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K. M., Chen, W., Knapp, W. und Zlabinger, G. J. (1992) A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. *Journal of Immunological Methods* 156: 39–45.
- Rota, C., Fann, Y. C. und Mason, R. P. (1999) Phenoxy Free Radical Formation during the Oxidation of the Fluorescent Dye 2',7'-Dichlorofluorescein by Horseradish Peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 28161–28168.
- Ruban, A.-V., Pascal, A.-A., Robert, B. und Horton, P. (2002) Activation of zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Journal of Biological Chemistry* 277: 7785–7789.
- Ruban, A. V., Young, A. und Horton, P. (1993) Induction of nonphotochemical energy dissipation and absorbance changes in leaves. *Plant Physiology* 102: 741–750.
- Scheller, H. V. (1996) In vitro cyclic electron transport in barley thylakoids follows two independent pathways. *Plant Physiology* 110: 187–194.
- Schinner, K. (2001) *Signalanalyse der Austauschvorgänge zwischen Photosynthese und Respiration in Hinblick auf die stickstoffformabhängige Lichtstreßresistenz*. Doktorarbeit, Christian Albrechts Universität Kiel.
- Schinner, K., B., S. und Hansen, U. P. (2001a) *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.* IPNC-Congress, Hannover, Aug. 2001.
- Schinner, K., Giannikos, I. und Hansen, U. (2000) Fluorescence clamp: A direct measure of fluxes into and out of the antenna pool of PS II. *Photosynthesis Research* 66: 109–123.
- Schinner, K., Sattelmacher, B. und Hansen, U.-P. (2001b) 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 Horst, W. J. und andere, Editoren, *Plant Nutrition. Food Security and Sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research* Seiten 102–103. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London.

- Schinner, K., Tabrizi, H. und Hansen, U. P. (1998) Indication for the Mehler reaction obtained from comparing photoacoustic, fluorescence clamp measurements. In Garab, G., Editor, *Photosynthesis: Mechanisms, Effects. Vol. III*. Seiten 1759–1762. Kluwer Academics Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Schnieder, F. (1998) *Molekulare Analyse der genetischen Struktur und Diversität deutscher und europäischer Populationen von Septoria tritici, dem Erreger einer Blattdürre an Weizen*. Doktorarbeit, Christian Albrechts Universität Kiel.
- Schnieder, F., Koch, G., Jung, C. und Verreet, J. A. (1998) Comparison of AFLP, RFLP an RAPID technic for genetic characterisation of *Septoria tritici* population. *Journal of Plant diseases and Protection* 105: 452–461.
- Schnieder, F., Koch, G., Jung, C. und Verreet, J. A. (2001) Genotypic diversity of the wheat leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*) in Germany. *European Journal of Plant Pathology* 107: 285–290.
- Schopfer, P., Plachy, C. und Frahry, G. (2001) Release of Reactive Oxygen Intermediates (Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, and Hydroxyl Radicals) and Peroxidase in Germinating Radish Seeds Controlled by Light, Gibberellin, and Abscisic Acid. *Plant Physiology* 125: 1591–1602.
- Schröder, I., Harlfinger, P., Huth, T. und Hansen, U. P. (2005) A subsequent fit of timeseries and amplitude histogram of patch clamp data reveals rate-constants up to  $1 \mu\text{s}^{-1}$ . *Journal of Membrane Biology* 160: (in press).
- Schreiber, U. und Bilger, W. (1993) III. Progress in chlorophyll fluorescence research: Major developments during the past years in retrospect. *Prog. Bot.* 54: 151–173.
- Schreiber, U., Klughammer, C. und Neubauer, C. (1988) Measuring P700 absorbance changes around 830 nm with a new type of pulse modulations system. *Zeitschrift für Naturforschung* 43 c: 656–698.
- Schreiber, U. und Krieger, A. (1998) Two fundamentally different types of variable chlorophyll fluorescence in vivo. *FEBS Letters* 397: 131–135.
- Schreiber, U. und Neubauer, C. (1990) O<sub>2</sub>-dependent electron flow, membran energization and the mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research* 25: 279–293.
- Schreiber, U., Reising, H. und Neubauer, C. (1991) Contrasting pH-optima of light-driven O<sub>2</sub>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reduction in spinach chloroplasts as measured via chlorophyll fluorescence quenching. *Zeitschrift für Naturforschung* 46 c: 635–643.
- Schreiber, U., Schliwa, U. und Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10: 51–62.
- Schwab, M., Noga, G. und Barthlott, W. (1993) Einfluss einer unzureichenden Mg- und Ca-Versorgung auf die Anfälligkeit von Kohlrabi gegenüber *Botrytis cinerea*. *Angew. Botanik*. 67: 180–185.
- Sessa, G. und Martin, G. B. (2000) Signal recognition and transduction mediated by the tomato Pto kinase: a paradigm of innate immunity in plants. *Microbes and Infection* 2: 1591–1597.
- Shaner, G. und Finney, R. (1976) Weather and epidemics of septoria leaf blotch of wheat. *Phytopathology* 66: 781–785.

- Shaner, G. und Finney, R. (1982) Resistance in red soft winter wheat to *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 72: 154–158.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. und Yoshimura, K. (2002) Regulation and function of ascorbate isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1305–1319.
- Siedow, J. N. und Umbach, A. L. (1995) Plant mitochondrial electron transfer and molecular biology. *The Plant Cell* 7: 821–831.
- Sitte, P., Weiler, E. W., Kadereit, J. W., Bresinsky, A. und Körner, C. (2002) *Strasburger - Lehrbuch der Botanik*. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin, 35. Auflage.
- Smart, M. G., Aist, J. R. und Israel, H. W. (1986) Structure and function of wall appositions. 1. General histochemistry of papillae in barley coleoptiles attacked by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Canadian Journal of Botany* 64: 793–801.
- Stotz, H. U., Koch, T., Biedermann, A., Weniger, K., Boland, W. und Mitchell-Olds, T. (2002) Evidence for regulation of resistance in *Arabidopsis* to Egyptian cotton worm by salicylic and jasmonic acid signaling pathways. *Planta* 215: 648–652.
- Strasser, R. J., Srivastava, A. und Govindjee (1995) Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.* 61: 32–42.
- Sziráki, I., Balázs, E. und Király, Z. (1975) Increased levels of cytokinin and indoleacetic acid in peach leaves infected with *Taphrina deformans*. *Physiol. Plant Pathol.* 5: 45–50.
- Tabrizi, H., Schinner, K., Spors, J. und Hansen, U. P. (1998) Deconvolution of the three components of the photoacoustic signal by curve fitting and the relationship of CO<sub>2</sub> uptake to proton fluxes. *Photosynthesis Research* 57: 101–115.
- Tarpey, M. M., Wink, D. A. und Grisham, M. B. (2004) Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 286: R431–R444.
- Thayer, S. S. und Björkman, O. (1990) Leaf Xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynthesis Research* 23: 331–343.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. und Collinge, D. B. (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal* 11: 1187–1194.
- Trayner, I. D., Rayner, A. P., Freeman, G. E. und Farzaneh, F. (1995) Quantitative multi-well myeloid differentiation assay using dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) or dihydrorhodamine 123 (H<sub>2</sub>R123). *Journal of Immunological Methods* 186: 275–284.
- Tucker, C. C. und Chakraborty, S. W. (1997) Quantitative assessment of lesion characteristics and disease severity using digital image processing. *Journal of Phytopathology* 145: 273–278.
- Turpin, D. H. und Bruce, D. (1990) Regulation of photosynthetic light harvesting by nitrogen assimilation in green alga *Selenastrum minutum*. *FEBS Letters* 263: 99–103.
- Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology* 552: 335–344.
- van Kooten, O. und Snel, J. F. H. (1990) The use of chlorophyll nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* 25: 147–150.

- Vanacker, H., Carver, T. und Foyer, C. (1998) Pathogen-Induces Changes in the Antioxidant Status of the Apoplast in Barley Leaves. *Plant Physiology* 117: 1103–1114.
- Vanlerberghe, G. C., Day, D. A., Wiskich, J. T., Vanlerberghe, A. E. und McIntosh, L. (1995) Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria: Dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation. *Plant Physiology* 109: 353–361.
- 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 Experimental Botany* 44: 1331–1340.
- Vanselow, K. H., Dau, H. und Hansen, U. P. (1988) Indication of transthylakoid proton-fluxes in *Aegopodium podagraria* L. by light-induced changes of plasmalemma potential, chlorophyll fluorescence and light scattering. *Planta* 176: 351–361.
- Vanselow, K. H. und Hansen, U. P. (1989) Rapid effect of light on the K<sup>+</sup>-channel in the plasmalemma of *Nitella*. *Journal of Membrane Biology* 110: 175–187.
- Vanselow, K. H., Kolbowski, J. und Hansen, U. P. (1989) Further evidence for the relationship between light-induced changes of plasmalemma transport and of transthylakoid proton uptake. *Journal of Experimental Botany* 40: 239–245.
- Vera-Estrella, R., Higgins, V. J. und Blumwald, E. (1994) Plant defense response to fungal pathogens: II. G-protein mediated changes in host plasma membrane redox reactions. *Plant Physiology* 106: 97–102.
- Verreet, J. A. (1995) *Angewandte Grundlagen des Integrierten Pflanzenschutzes*. PR GmbH Werbeagentur und Verlag, Aachen.
- Verreet, J. A., Klink, H. und Hoffmann, G. M. (2000) Regional monitoring for disease prediction and optimization of plant protection measures: the ipm wheat model. *Plant disease* 84: 816–826.
- Wedel, N., Soll, J. und Paap, B. (1997) CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 10479–10484.
- Wei, Y. D., De Neergaard, E., Thordal-Christensen, H., Collinge, D. B. und Smedegaard-Petersen, V. (1994) Accumulation of a putative guanidine compound in relation to other early defence reactions in epidermal cells of barley and wheat exhibiting resistance to *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 469–484.
- Wiese, C., Lan-bo Shi und Heber, U. (1998) Oxygen reduction in the Mehler reaction is insufficient to protect photosystems I and II of leaves against photoinactivation. *Physiologia Plantarum* 102: 437–446.
- Witt, H. T. (1979) Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis with light pulses and electric pulse methods. *Biochimica et Biophysica Acta* 505: 355–427.
- Wu, J., Neimanis, S. und Heber, U. (1991) Photorespiration is more effective than the Mehler reaction in protecting the photosynthetic apparatus against photoinhibition. *Botanica Acta* 104: 283–291.
- Yamamoto, H. Y. und Kamite, L. (1972) The Effects of Dithiothreitol on Violaxanthin Deepoxidation and Absorbance Changes in the 500-nm Region. *Biochimica et Biophysica Acta* 267: 538–543.

- Zhu, Z., Gerendás, J., Bendixen, R., Schinner, K., Tabrizi, H., Sattelmacher, B. und Hansen, U. (2000) Different Tolerance to Light Stress in  $\text{NO}_3^-$ - and  $\text{NH}_4^+$ -Grown *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Biology* 2: 558–570.
- Zuckerman, E., Eshel, A. und Eyal, Z. (1997) Physiological aspects related to tolerance of spring wheat cultivars to *Septoria tritici* blotch. *Phytopathology* 87: 60–65.
- Zulu, J. N., Farrar, J. F. und Whitbread, R. (1991) Effects of phosphate supply on the phosphorus state, dry mass and photosynthesis of wheat infected with powdery mildew. *New Phytologist* 118: 453–461.
- Zwinger, K. und Hirt, H. (2001) Recent advances in plant MAP kinase signalling. *Biological Chemistry* 382: 1123–1131.

# Danksagung

An erster Stelle geht mein Dank an Prof. Ulf-Peter Hansen für die sehr gute Betreuung, welche mir durch fruchtbare Diskussionen unterstützt ein eigenständiges Arbeiten ermöglichte. Auch für die Schaffung der Finanzierung durch die DFG und ein Stipendium möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein weiterer Dank geht an Katrin Schinner für die Einführung in die Photosynthese in guter Laboratmosphäre, Anne Hoffmann für die gute Zusammenarbeit im Pilzprojekt, sowie an die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Biophysik und des ZBMs, Indra Schröder, Tobias Huth, Christoph Plieth, Anja Hümpel, Sabine Milde, Afshin Farokhi, Maike Abshagen, Ogün Cakan, für die gute und angenehme Atmosphäre und interessante Teerunden.

Dann möchte ich mich bei Dr. Christoph Plieth, Steffi Schnell und Christin Thiele für die Unterstützung meiner Arbeit im ZBM und ihre Hilfe bedanken. Ebenso geht ein Dank an Dr. Frank Schnieder und an seine TA's für die Anzucht des Weizens und der Pilze sowie die gemeinsame Arbeit im DFG-Projekt.

Ein weiter Dank geht an Prof. Wolfgang Bilger für die Ermöglichung der HPLC-Messungen und an Dr. Hartmut Kaiser für die Möglichkeit, an seiner Anlage und mit seiner Hilfe die Messungen an den Stomata durchführen zu können.

Bei Dr. Christine Desel möchte ich mich für die Unterstützung bei den ROS-Farbstoff-Messungen bedanken, sowie bei Markus Boettcher für die Messungen am konfokalen Mikroskop.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Martin Beutler für die Zurverfügungstellung des Algenspektrometers.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Freunden für ihre Unterstützung bedanken.



# Lebenslauf

## Angaben zur Person:

Name: Enno Peter Hammes

Geburt: 27.8.1974 in Kiel

Familienstand: ledig, keine Kinder

Staatsangehörigkeit: deutsch

## Ausbildung:

Grundschule: Dr.-Gerlich-Schule in Trappenkamp von August 1981 bis Juli 1985

Gymnasium: Städtisches Gymnasium Bad Segeberg von August 1985 bis Juni 1994

Studium der Physik: Ab Oktober 1995 an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel  
November 1997: Vordiplom, Note: Sehr gut  
Januar 2001: Diplom, Note: Sehr gut  
Diplomarbeit: „Entwicklung eines Messaufbaus zum Biomonitoring mit Hilfe von Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen vom Fahrzeug“

Promotion: Januar 2001 bis März 2005 am Zentrum für Biochemie und Molekularbiologie (ZBM) der CAU in Kiel