

Institut für Forstbotanik

**Anpassung antioxidativer Systeme an Licht und
Temperatur: holzige und krautige Pflanzen im
Vergleich**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades an der Fakultät für
Forstwissenschaften und Waldökologie der Georg-August-
Universität Göttingen

vorgelegt von

Detlef Peltzer

geboren in Helmarshausen

Göttingen 2001

1. Gutachterin: Prof. Dr. Andrea Polle
2. Gutachter: Prof. Dr. Friedrich Beese

Tag der mündlichen Prüfung: 28.März 2001

Danksagung

Bei Frau Professorin Dr. Polle bedanke ich mich für ihr intensives Engagement bei der Betreuung meiner Arbeit. Ihrem Einsatz habe ich auch zu verdanken, daß diese Arbeit finanziell abgesichert war.

Herrn Prof. Dr. Beese danke ich, daß er sich sofort bereit erklärte, sich als zweiter Gutachter dieser Arbeit zur Verfügung zu stellen.

Herrn Dr. Schwanz gilt mein Dank für die Bestimmung der Ascorbatkonzentrationen mittels HPLC in Buntnesselblättern (Peltzer et al. 1999b) und die Durchführung der Streßversuche mit Methylviologen (Peltzer et al. 1999a). Desgleichen bedanke ich mich bei ihm für die Mithilfe bei den Streßversuchen mit Methylviologen in unserem „Birmensdorf-Projekt“ (Polle et al. 2001).

Herrn Dr. E. Dreyer, Leiter der Equipe Bioclimatologie-Ecophysiologie, Unité d'Ecophysiologie Forestière der INRA Nancy in Champenoux, danke ich für die kompetente Einführung in die Grundlagen der Chlorophyllfluoreszenz und seine freundliche Betreuung während meines Aufenthaltes an der INRA von Mai bis Juli 1999. Ich möchte mich außerdem sehr für seine rasche und kritische Durchsicht unseres Manuskriptes (Peltzer et al. 2001c) bei ihm bedanken.

Der Europäischen Union verdanke ich die Finanzierung meines Aufenthaltes in Champenoux, Frankreich im Rahmen eines PROCOPE Projektes.

Frau C. Rudolph danke ich für die Mithilfe bei umfangreichen enzymatischen Untersuchungen, die ich alleine nicht hätte bewältigen können.

Frau M. Smiatacz hat die Versuchspflanzen hervorragend gepflegt und auch unsere empfindliche Buntnesselvariante bei bester Gesundheit gehalten.

Herzlichen Dank meinen Kolleginnen und Kollegen für fachliche und manchmal auch psychische Unterstützung. Besonders Herrn Dr. Schützendübel für Tips und Hilfen bei Untersuchungen an der HPLC und der CE.

Folgende Veröffentlichungen sind integraler Bestandteil dieser Dissertationschrift:

Peltzer D, Polle A (2001) Diurnal fluctuations of antioxidative systems in leaves of field-grown beech trees (*Fagus sylvatica*): Responses to light and temperature. *Physiologia Plantarum* 111: 158-163.

Peltzer D, Dreyer E, Polle A (2001) Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes under photosynthetic and non-photosynthetic conditions in two species, *Fagus sylvatica* (L.) and *Coleus blumei* (Benth.). *Plant Physiology and Biochemistry* (eingereicht).

Peltzer D, Schwanz P, Polle A (1999a) Charakterisierung der Anpassung von Buchenblättern (*Fagus sylvatica*, L.) an unterschiedliche Lichtbedingungen: Bielefelder Ökologische Beiträge, Ökophysiologie pflanzlicher Interaktionen 14 (II): 248-286.

Peltzer D, Schwanz P, Polle A (1999b) Preliminary studies of ascorbate metabolism in green and albino regions of variegated leaves of *Coleus blumei*, Benth.. *Free Radical Research* 31: 181-185.

Polle A, Peltzer D, Schwanz P (2001) Resistance against oxidative stress in leaves of young beech trees grown in model ecosystems with different soil qualities, elevated CO₂, and lachnid infestation. *Fostwissenschaftliches Centralblatt* 120: 1-7.

Anpassung antioxidativer Systeme an Licht und Temperatur: holzige und krautige Pflanzen im Vergleich

Inhaltsverzeichnis:

I. Einleitung	8
I. 1 Die Rolle von Standortfaktoren.....	8
I. 2 Entstehung von oxidativem Streß bei der Photosynthese	9
I. 3 Abwehr von oxidativem Streß durch antioxidative Systeme.....	11
I. 4 Ziel der Arbeit.....	13
II. Methodische Grundlagen	13
II.1 Bestimmung von antioxidativen Substraten und Enzymen	13
II.2 Gaswechsel und Chlorophyllfluoreszenz	14
III. Ergebnisse	16
III. 1 Einfluß hoher und niedriger Temperaturen auf Photosyntheseparameter in unterschiedlichen Baumspesies.....	16
III. 2 Thermotoleranz des PS II.....	17
III. 3 Erholung nach Photoinhibition.....	20
VI. Langzeitanpassung von Buchenblättern an unterschiedliche Lichtbedingungen	23
VII. Temperaturabhängigkeiten antioxidativer Enzyme in photosynthetisch aktiven und inaktiven Geweben von <i>Fagus sylvatica</i> (L.) und <i>Coleus blumei</i> (Benth.).....	30
VIII. Untersuchungen zur Ascorbatsynthese	32
IX. Reaktionen des antioxidativen Systems in Buchenblättern (<i>Fagus sylvatica</i>) auf unterschiedliche Licht- und Temperaturbedingungen im Freiland.....	33
X. Zusammenfassung.....	35
XI. Literatur	39
Lebenslauf.....	44

Abkürzungsverzeichnis

AA: Ascorbat

APX: Ascorbatperoxidase

DHA: Dehydroascorbat

DHAR: Dehydroascorbatreduktase

F₀: Grundfluoreszenz nach Dunkelanpassung

F_t: Grundfluoreszenz im Licht

F₀' : steady-state Fluoreszenz, Grundfluoreszenz nach Abschalten des aktinischen Lichtes

F_m⁰: maximale Fluoreszenz nach Dunkelanpassung

F_m' : maximale Fluoreszenz im Licht

GR: Glutathionreduktase

GaldH: L-Galactose-Dehydrogenase

MDAR[•]: Monodehydroascorbatradikale

MDAR: Monodehydroascorbatradikalreduktase

NPS: Nettphotosynthese

O₂^{•-}: Superoxidradikale

OH[•]: Hydroxylradikale

Q_A: Plastochinon A

PAR: photosynthetisch aktive Strahlung

SOD: Superoxiddismutase

PS I, PS II: Photosystem I und II

φ_{psII}: relative Elektronentransportkapazität des Photosystems II

I. Einleitung

I. 1 Die Rolle von Standortfaktoren

Pflanzen sind den herrschenden Umweltbedingungen ausgesetzt und müssen sich an sich ändernde Faktoren, wie Licht, Temperatur, Wasser- und Nährelementangebot anpassen. Sie können sich ökologisch einnischen, aber den Streßfaktoren ihrer Umwelt nicht ausweichen. Es wird zwischen zwei Arten der Streßtoleranz unterschieden: Avoidance (Streßvermeidung) und Defense (Streßbekämpfung).

Die Buche ist im atlantisch geprägten Mitteleuropa die konkurrenzstärkste Baumart. Sie bildet potentiell auf fast allen Standorten Reinbestände (Ellenberg 1988). Entsprechend wird die Buche in modernen, naturnahen Waldbaukonzepten als Hauptbaumart bis in den submontanen Bereich wieder in großem Umfang berücksichtigt (LÖWE-Projekt und andere). Die Buche bildet Licht- und Schattenblätter aus (Eschrich et al. 1989), die sich in ihrer Anatomie unterscheiden. Das bedeutet, daß sie nach entsprechender Anpassung direkte Sonne erträgt und gleichzeitig im Unterstand sehr schattentolerant ist.

Bei Pflanzung auf der Freifläche oder nach Freistellung, die eine starke Änderung des Temperatur- und Lichtmikroklimas hervorruft, leidet die Buche unter den veränderten Umweltbedingungen (Cochard et al. 1999). Andererseits ist sie auch im hohen Alter noch in der Lage, auf ein erhöhtes Lichtangebot nach Lichtungshieben mit verstärktem Wachstum zu reagieren.

Aufgrund eines zu erwartenden Anstiegs des atmosphärischen CO₂ ist es möglich, daß in Zukunft die Sommer heißer und trockener werden. Es stellt sich die Frage, ob die Buche in der Lage ist, auf höheren Temperaturstreß mit einer Erhöhung ihrer Streßtoleranz zu antworten. Es ist bisher wenig untersucht, welche Toleranzgrenzen die Buche gegenüber Veränderungen der Umweltbedingungen aufweist und welche physiologischen Faktoren dafür ausschlaggebend sind. Die vorliegende Arbeit greift dieses Problem auf und führt dazu ökophysiologische Untersuchungen der Photosynthese (CO₂/H₂O-Gaswechsel, Chlorophyllfluoreszenz, siehe Absatz II) sowie physiologische Untersuchungen antioxidativer Schutzsysteme durch.

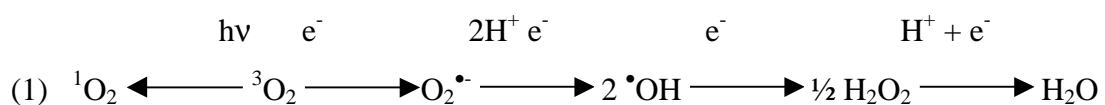
Um die Reaktionsweise der Buche besser zu verstehen, wurden vergleichend zwei Spezies mit anderen ökologischen Ansprüchen in die Untersuchungen einbezogen: die Birke (*Betula verrucosa*) und eine grün-weiß panaschierte Form der Buntnessel (*Coleus blumei*).

Die Birke kommt ähnlich wie die Buche auf fast allen Standorten in unseren Breiten vor. Sie ist jedoch eine Pionierbaumart, die hohe Lichtansprüche hat und deshalb im Laufe einer normalen Sukzession in Mitteleuropa von der Buche verdrängt („ausgedunkelt“) wird. Die Buntnessel ist eine Zierpflanze aus den asiatischen und afrikanischen Tropen. Sie ist an gleichmäßig hohe Temperaturen angepaßt und empfindlich gegenüber niedrigen und sehr hohen Temperaturen. An ihr konnten gleichzeitig Untersuchungen in grünen, das heißt photosynthetisch aktiven, und weißen, photosynthetisch inaktiven Blattbereichen vorgenommen werden. Damit konnte der Einfluß von Licht und Temperatur auf das antioxidative System unabhängig von der Photosynthese beobachtet werden.

I. 2 Entstehung von oxidativem Streß bei der Photosynthese

Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies ist im Zellmetabolismus aerober Organismen unvermeidlich (Asada 1994, Winston 1990, Scandalios 1993). Diese Belastung wird als oxidativer Streß bezeichnet. Extreme Temperaturen und hohe Lichtintensitäten sind natürlich auftretende Faktoren, die oxidativen Streß hervorrufen (Polle und Rennenberg 1993, Polle 1996). Reaktive Sauerstoffspezies führen im lebenden Gewebe zur unspezifischen Oxidation von Proteinen und Lipiden, damit unter anderem zu Membranschäden.

In photosynthetisch aktiven Geweben ist die Sauerstoffkonzentration besonders hoch. Damit ist eine höhere Belastung durch oxidativen Streß verbunden. Während Sauerstoff im Triplettzustand ($^3\text{O}_2$) verhältnismäßig reaktionsträge ist, kann durch Anregung das Sauerstoffmolekül in die stark reaktiven Formen des Singulett-Sauerstoffes ($^1\text{O}_2$) überführt werden (Scandalios 1993) oder durch sukzessive Reduktion weitere reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidradikale ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale (OH^{\bullet}) (Elstner 1983) gebildet werden (Gleichung 1).



Unter günstigen Bedingungen können Pflanzen die Blattemperaturen durch erhöhte Transpiration senken (Mahan et al. 1994, Yordanov et al. 2000). Häufig jedoch sind hohe

Temperaturen mit Trockenstreß verbunden. Um einen zu hohen Wasserverlust zu vermeiden, schließen sie die Stomata (Chaves und Peirera 1992). Dies unterbindet den CO_2 -Austausch zwischen Atmosphäre und Mesophyll. Damit wird die Assimilation im Calvin-Zyklus eingeschränkt, und weniger NADP^+ steht als terminaler Elektronenakzeptor der Primärprozesse der Photosynthese zur Verfügung (Polle 1996). Andererseits steigt die Rate der Photorespiration aufgrund der kompetitiven Bindung von CO_2 und O_2 durch die Ribulosebiphosphatcarboxylase/Oxygenase, die sich dann zugunsten des Sauerstoffes verschiebt. Durch die Freisetzung von CO_2 fungiert die Photorespiration als effektive Elektronensenke (Wu et al. 1991, Osmond und Grace 1995, Heber et al. 1996) und schützt so die Pflanze vor den Folgen einer Überreduktion.

In Abbildung 2 wird schematisch der Elektronentransport in Thylakoiden bei Belichtung dargestellt. Beim zyklischen Elektronentransport werden Elektronen vom Ferredoxin des Photosystems I wieder auf den Cytochrom b_6f übertragen. Dieser Mechanismus erhöht die Energetisierung der Thylakoiden und führt zu einer zusätzlichen Bildung von ATP durch den höheren Protonengradienten zwischen dem Thylakoidlumen und dem Stroma des Chloroplasten (Heber et al. 1995).

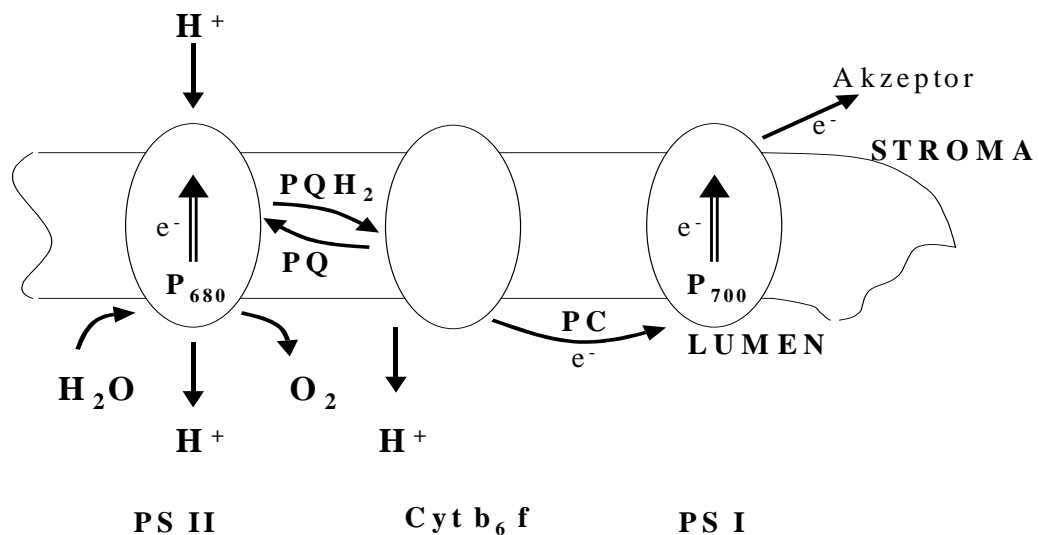


Abb. 1: Schematische Darstellung des Elektronentransportes in Thylakoiden bei Belichtung. Die Pfeile stellen die Bewegungsrichtung der Elektronen und Protonen in und zwischen den integralen Membranproteinkomplexen, Photosystem II (PS II), dem Cytochrom b_6f -Komplex (Cyt b_6f) und Photosystem I (PS I) dar. Abkürzungen: PQ Plastichon, PC Plastocyanin. Aus: Jahns et al. 1988.

Ein Teil der photosynthetisch gebildeten Elektronen kann durch die „Mehler“-Reaktion (pseudozyklischer Elektronentransport) auf Sauerstoff übertragen werden (Mehler 1951, Furbank und Badger 1983, Asada 1994). Die Rate der Mehler-Reaktion, die am Ferredoxin mit der Reduktion von NADP^+ konkurriert, beträgt im Blatt 4 – 7% unter „normalen“ Bedingungen. Unter Streß werden dabei Werte von bis zu 30% erreicht (Bieler und Fock 1996, Asada 1999). Einerseits wird damit der Elektronendruck auf Q_A verringert (Ventilwirkung), andererseits trägt die Mehler-Reaktion in Streßsituationen damit zu einer erhöhten Produktion von reaktivem Sauerstoff bei (Polle 1996).

Das bei diesem Prozeß entstandene Superoxidradikal wird im weiteren Verlauf durch SOD entgiftet (Abb. 2). Dabei entsteht als Zwischenprodukt H_2O_2 . Die Akkumulation von H_2O_2 muß verhindert werden, da es zusammen mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ zur Entstehung der extrem reaktiven Hydroxylradikale OH^{\bullet} führen kann. OH^{\bullet} verursacht in isolierten Chloroplasten eine Inaktivierung des PS I und PS II (Jakob und Heber 1996).

I. 3 Abwehr von oxidativem Streß durch antioxidative Systeme

Im lebenden Blatt sind die Entgiftungsmechanismen für reaktive Sauerstoffspezies so effektiv, daß es unter normalen Bedingungen nicht zu einer Inaktivierung der Photosysteme kommt (Jakob und Heber 1996, Asada 1999). Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Verbindung Ascorbat (Vitamin C), die im Ascorbat-Glutathion-Zyklus (Foyer und Halliwell 1976, Nakano und Asada 1987) und in der Mehler-Peroxidase-Reaktion (Asada 1994) an der Entgiftung von H_2O_2 beteiligt ist (Abb. 2).

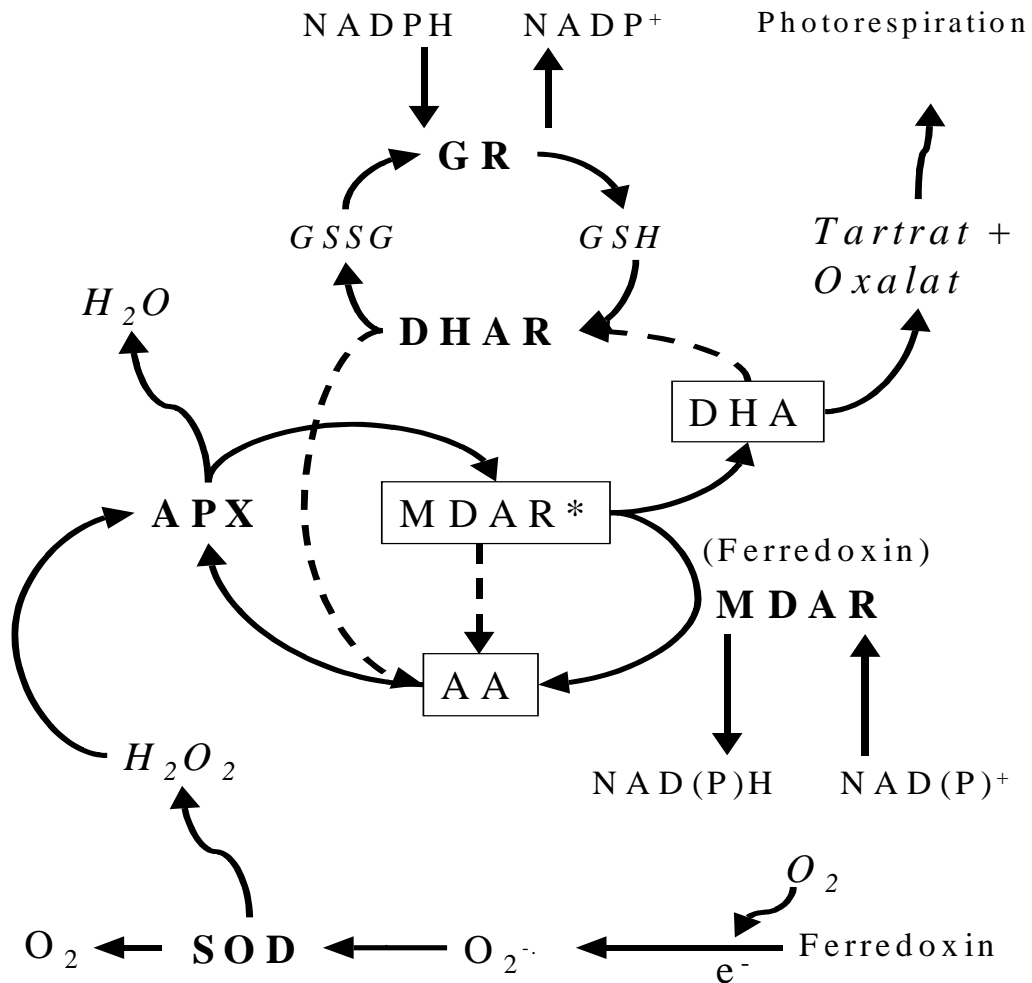


Abb. 2: *Metabolismus von Ascorbat im Ascorbat-Glutathion-Zyklus (verändert nach Foyer et al. 1994). Abkürzungen: AA: Ascorbat, APX: Ascorbatperoxidase, DHA: Dehydroascorbat, DHAR: Dehydroascorbatreduktase, GR: Glutathionreduktase, GSH: Glutathion, GSSG: Glutathiondisulfid, MDAR[•]: Monodehydroascorbatradikale, MDAR: Monodehydroascorbatradikalreduktase, SOD: Superoxiddismutase. Schematische Darstellung, nicht stöchiometrisch.*

Ist NADP⁺ an der Akzeptorseite von PS I nicht in ausreichender Menge vorhanden, kann Sauerstoff anstelle von NADP⁺ reduziert werden. In diesem kompetitiven System dient O₂ als "Ventil" für die überschüssigen Elektronen zum Schutz vor Photoinhibition (Polle 1996). Die entstehenden Superoxidradikale werden enzymatisch über die Superoxiddismutase (SOD) entgiftet (Abb. 2). Hierbei entsteht H₂O₂. Unter Oxidation von Ascorbat zu Monodehydroascorbatradikalen (MDAR[•]) reduziert die Ascorbatperoxidase (APX) in einem folgenden Schritt H₂O₂ zu H₂O (Abb. 2) (Nakano und Asada 1987). Monodehydroascorbatradikale können spontan zu Dehydroascorbat und Ascorbat

dissoziieren (Abb. 2). Dehydroascorbat wird durch die Dehydroascorbatreduktase (DHAR) unter Oxidation von Glutathion zu Glutathiondisulfid reduziert. Letzteres wird durch die Glutathionreduktase (GR) unter Oxidation von NADPH zu NADP⁺ wieder reduziert (Abb. 2).

Parallel zum Ascorbat-Glutathion-Zyklus gibt es ein weiteres Enzym zur Reduktion der MDAR[•] zu Ascorbat, die Monodehydroascorbatradikalreduktase (MDAR). Sie katalysiert die Reduktion der MDAR[•] unter Verbrauch von NADH oder NADPH (Borracino et al. 1989). Zum anderen können MDAR[•] auch direkt durch Ferredoxin reduziert werden (Abb. 2) (Miyake und Asada 1984).

I. 4 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Ascorbat als Antioxidans und mit den Enzymen, die für seine Reduktion, Oxidation und Synthese verantwortlich sind. Es war das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, welchen Einfluß Licht und Temperatur auf die Entgiftung von O₂^{•-} durch das antioxidative System haben. Es sollte dabei zwischen kurzfristigen und langfristigen Anpassungsmechanismen an Licht und Temperatur unterschieden werden und dabei der Einfluß dieser beiden Parameter voneinander getrennt werden. Dafür wurden enzymatische und nichtenzymatische Komponenten antioxidativer Systeme in Experimenten bestimmt. Um dabei Informationen über den Elektronentransport im PS II und eine mögliche oxidative Belastung des Blattgewebes zu gewinnen, wurden Chlorophyllfluoreszenz und Photosynthese bestimmt. Des Weiteren wurde unterschieden zwischen dem Einfluß, den Licht direkt auf das antioxidative System hat und dem Einfluß, den Licht indirekt über die Photosynthese auf das antioxidative System ausübt.

II. Methodische Grundlagen

II.1 Bestimmung von antioxidativen Substraten und Enzymen

Die Aktivitäten antioxidativer Enzyme wurden photometrisch bestimmt nach Nakano und Asada (1987) für APX, Borracino et al. (1989) für MDAR und Foyer und Halliwell (1976) für GR. Die Bestimmung der Aktivitäten der GalDH erfolgte wie in Peltzer et al. (1999b) beschrieben. Ascorbatkonzentrationen wurden mittels HPLC oder Capillar-Elektrophorese

(Peltzer et al. 1999b) oder photometrisch bestimmt (Peltzer et al. 1999a, Peltzer und Polle 2001, Peltzer et al. 2001), Glutathionkonzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt, wie bei Peltzer et al. (2001) beschrieben.

II.2 Gaswechsel und Chlorophyllfluoreszenz

Die Photoassimilation wurde anhand von Gaswechselfmessungen (HCM-1000, Walz, Effeltrich, Deutschland) bestimmt. Das zu untersuchende Blatt wurde in eine Küvette mit Lichtaufsatz eingespannt, und bei unterschiedlichen Lichtintensitäten wurden die Raten der Nettophotosynthese (NPS) gemessen. Dabei bestimmte das HCM-1000 die Differenz des CO₂-Gehaltes im Luftstrom vor dem Eintritt und nach dem Austritt aus der Küvette mit einem Infrarot-Gasanalysator. Analog dazu wurden Veränderungen der H₂O-Gehalte vor und nach passieren der Küvette bestimmt. Die Temperatur in der Küvette wurde auf 24°C eingestellt.

Die Chlorophyllfluoreszenz wurde mit einem pulsmoduliertem Fluoreszenzmesser (Mini-Pam, Walz, Effeltrich, Deutschland) nach Genty et al. (1989) und Krause und Weis (1991) untersucht:

F_0 (F_t): Grundfluoreszenz im Dunkeln (im Licht)

F_m^0 (F_m^{\wedge}): maximale Fluoreszenz im Dunkeln (im Licht)

und berechnet

$F_m^0 - F_0 = F_V$ ($F_m^{\wedge} - F_t = F_V^{\wedge}$): variable Fluoreszenz im Dunkeln (im Licht)

$(F_V)/F_m^0 =$ relative Elektronentransportrate nach Dunkelanpassung, bzw.

$(F_V^{\wedge})/F_m^{\wedge} =$ relative Elektronentransportrate bei aktinischem Licht

$\phi_{PSII} = (F_V)/F_m^0$ (im Dunkeln) oder $(F_V^{\wedge})/F_m^{\wedge}$ (im Licht)

Das Fluoreszenzsignal ist zu etwa 95% auf das Chlorophyll a, das an das PS II gebunden ist, zurückzuführen (Krause und Weis 1991). Liegt der gesamte Pool von Q_A im oxidierten („offenen“) Zustand vor, wird nur ein geringer Teil der einfallenden Energie in Form von Fluoreszenz abgestrahlt. Dieser Zustand kann nur nach Dunkelanpassung erreicht werden, F_0 zeigt dann seinen niedrigsten Wert (Abb. 3). Wenn in diesem Zustand ein sättigender Lichtblitz ($>2000 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) gegeben wird, wird der höchstmögliche Fluoreszenzwert ermittelt, F_m^0 (Abb. 3). Q_A wird durch den Lichtblitz vollständig reduziert, die Fluoreszenz zeigt in dem Moment den Wert an, der der maximalen photochemischen und der

maximalen nichtphotochemischen Energielöschung entspricht. Werden die gleichen Messungen bei Belichtung durchgeführt, liegt Q_A teilweise bereits im reduzierten Zustand vor. Dem entspricht F_t (Abb. 3), das höher ist als F_0 , da ein Teil der auftreffenden Lichtenergie durch den bereits reduzierten Anteil an Q_A nicht photochemisch genutzt werden kann. F_m' , das wiederum nach einem sättigenden Lichtblitz gemessen wird, ist niedriger als F_m^0 (Abb. 3). Da der Lichtblitz kurzfristig die Elektronentransportkette vollständig aufreduziert und damit die Photosynthese blockiert, spiegelt die Differenz aus F_m^0 und F_m' den Anteil nichtphotochemischer Energielöschung wider. Φ_{PSII} ist ein Ausdruck für die maximale Elektronenleitfähigkeit im PS II, die im gesunden Blatt fest bei 0.832 ± 0.004 liegt (Krause und Weis 1991). Φ_{PSII} im Licht gibt deshalb einen Hinweis auf den Redoxstatus von Q_A bei der gegebenen Belichtung. Je höher dieser Wert ist, desto mehr Elektronen fließen durch das PS II; je niedriger der Wert ist, desto mehr Elektronen werden aktuell nichtphotochemisch entsorgt. Ein hohes F_0 und niedrige Werte von Φ_{PSII} weisen auf eine Schädigung des PS II hin (Willert et al. 1995).

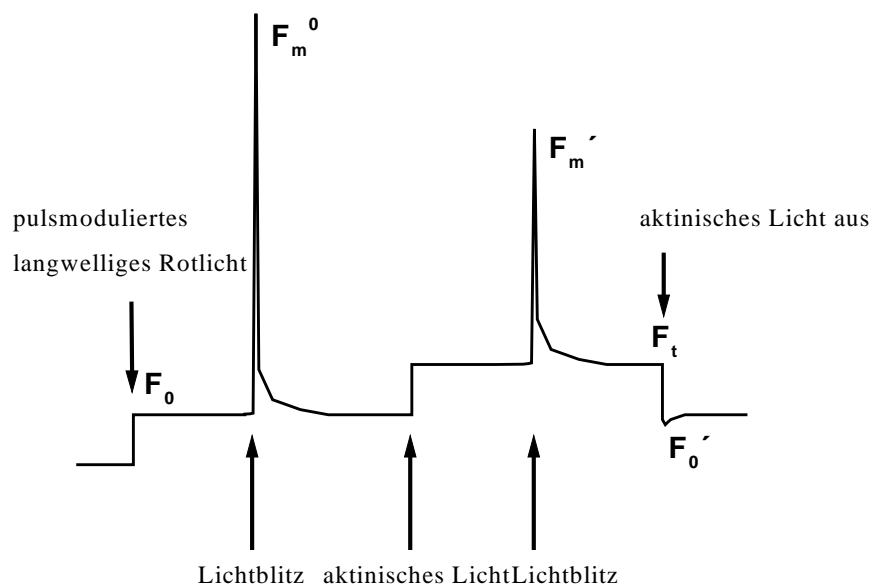


Abb. 3: Schema der Fluoreszenzinduktion nach Anregung der Antennenpigmente durch schwaches, langwelliges und pulsierendes Rotlicht nach Dunkelanpassung der Blätter (F_0), nach kurzfristiger Reduktion aller Elektronenakzeptoren im Photosystem II durch einen sättigenden Lichtblitz (F_m), nach Einschalten aktinischen (=photosynthetisch aktivierenden) Lichtes (F_0') und nach erneutem sättigendem Lichtblitz während der Belichtung durch aktinisches Licht (F_m').

III. Ergebnisse

III. 1 Einfluß hoher und niedriger Temperaturen auf Photosyntheseparameter in unterschiedlichen Baumspezies

Um zu untersuchen, ob die Reaktion der photosynthetischen Elektronentransportrate von Buchen und Birken sich bei unterschiedlichen Temperaturen unterscheidet, wurde ϕ_{PSII} im Licht und im Dunklen an beiden Baumarten bei verschiedenen Temperaturen von 10 bis 40°C gemessen. Um zu überprüfen, ob der Photosyntheseapparat der Buche empfindlicher als der der Birke auf Temperaturänderungen reagiert, wurde ϕ_{PSII} im Temperaturbereich von 10°C bis 40°C bestimmt (Abb. 4).

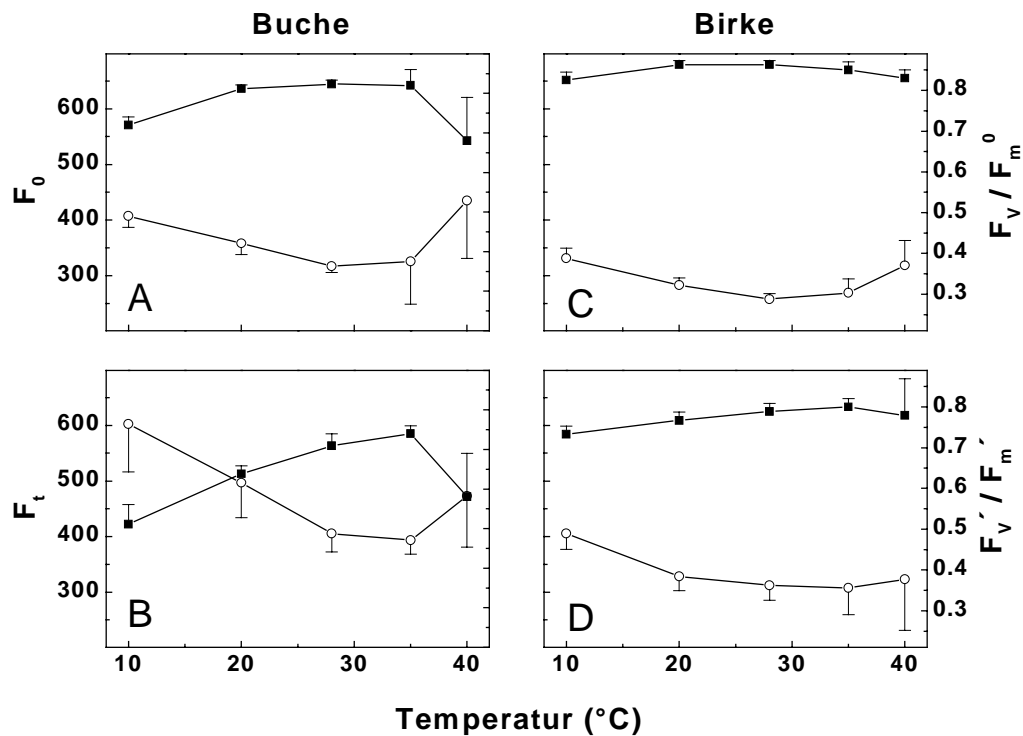


Abb. 4: Fluoreszenz 3jähriger Buchen (*Fagus sylvatica*, A und B) und Birken (*Betula verrucosa*, C und D) im Licht (B und D) und Dunkeln (A und C) bei unterschiedlichen Lufttemperaturen (10 bis 40°C). Die Daten stellen Mittelwerte dar mit $n=25$ (5 Individuen à 5 Blätter) \pm SD. ■: F_v/F_m^0 und F_v'/F_m' , ○: F_0 und F_t . Die Pflanzen wurden jeweils 3 Tage lang in einer Klimakammer an die jeweilige Temperatur angepaßt bei 16 Stunden Beleuchtung pro Tag ($300 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$).

Die relative Elektronentransportrate der Buche im Dunkeln (Φ_{PSII}) stieg nach Erhöhung der Umgebungstemperatur von 10 auf 20°C um 11% und blieb bis 28°C relativ konstant (Abb. 4 A). Φ_{PSII} der Buche zeigte einen gegensätzlichen Verlauf nach Dunkelanpassung. Erst bei 40°C sanken diese Werte. Gleichzeitig wurde ein Anstieg von F_0 beobachtet (Abb. 4 A). Im Licht war eine ähnliche Situation zu beobachten. Während bei steigenden Temperaturen bis 35°C F_0' sank, stieg Φ_{PSII} im Licht an (Abb. 4 B). Bei 40°C stieg F_0' wieder an, während Φ_{PSII} im Licht abrupt fiel (Abb. 4 B).

Die Birke verhielt sich deutlich indifferenter gegenüber hohen Temperaturen als die Buche (Abb. 4 C, D). Nach Dunkelanpassung wurden bei der Birke etwas erhöhte Werte von F_0 bei 10 und bei 40°C, niedrigste Werte bei 28°C beobachtet (Abb. 4 C). Dies läßt vermuten, daß etwa hier die Optimaltemperatur für die Aktivität des PS II lag. Φ_{PSII} zeigte nach Dunkelanpassung durchweg optimale Werte von etwa 0.83 (Abb. 4 C). Im Licht stieg Φ_{PSII} in Birkenblättern bis 35°C und zeigte nur einen leichten Einbruch bei 40°C (Abb. 4 D).

Schlußfolgerung: Die Beobachtungen der Chlorophyllfluoreszenz von Buchen und Birken bei unterschiedlichen Temperaturen entsprechen den mikroklimatischen Gegebenheiten der natürlichen Standorte dieser Baumarten. Die Buche wächst im Bestand in einem ausgeglichenen Klima, damit besteht für sie nicht die Notwendigkeit, sich ständig starken Änderungen ihrer Umwelt anzupassen. Der photosynthetische Elektronenfluß der Birke als Pionierbaumart ist regelmäßig auftretenden großen Temperaturschwankungen besser angepaßt als der der Buche. Damit ist jedoch noch nicht geklärt, ob die beobachteten Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenz eine Streßvermeidung oder einen Abwehrmechanismus anzeigen.

III. 2 Thermotoleranz des PS II

Pflanzen sind in der Regel in der Lage, über Transpiration oder Veränderung der Blattausrichtung ihre Blattemperatur zu senken (Mahan et al. 1994, Yordanov et al. 2000). Um zu untersuchen, ob die unterschiedliche Toleranz gegenüber veränderten Lufttemperaturen, die zwischen Buche und Birke gemessen wurde (Abb. 4), darauf zurückzuführen ist, daß die Birke den Temperaturanstieg im Blatt vermeiden kann, wurde die kritische Temperatur des PS II ermittelt.

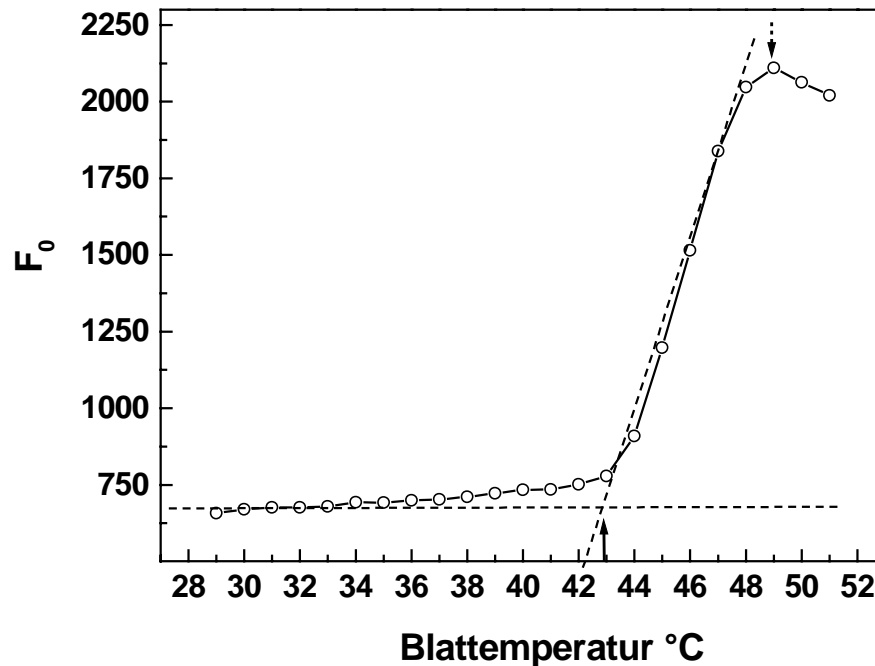


Abb. 5: Ermittlung des kritischen Temperaturpunktes des PS II am Beispiel der Buntnessel (*Coleus blumei*, grüner Blatteil). Eine Blattscheibe wurde in die entsprechende Vertiefung eines beheizbaren Aluminiumblockes gelegt und die Temperatur über ein Pelletierelement pro Minute um 1°C erhöht. Dabei wurde F_0 gemessen (offene Symbole). Über den anfänglichen Verlauf von F_0 und im Bereich, in dem F_0 anstieg wurde eine Gerade gelegt. Der Schnittpunkt dieser Geraden bezeichnet den kritischen Punkt für das PS II (Pfeil unten, 43°C). Ab 49°C war das PS II irreversibel geschädigt (Pfeil oben).

Abbildung 5 zeigt anhand eines Beispiels, wie die kritische Temperatur des PS II ermittelt wurde. F_0 verändert sich zunächst mit steigender Blattemperatur kaum, bis eine kritische Temperatur erreicht wird. Bei Erreichen der kritischen Temperatur steigt F_0 zunächst stark an. Sobald das PS II irreversibel zerstört wird, sinkt F_0 wieder ab. Wird der Verlauf von F_0 in Abhängigkeit von der Blattemperatur aufgezeichnet, kann je eine Gerade durch den Anfangsverlauf (F_0 niedrig) und durch den Verlauf nach Erreichen einer kritischen Temperatur (F_0 stark ansteigend) gelegt werden (Abb. 5). Der Punkt, an dem sich die

beiden Geraden schneiden, bezeichnet den kritischen Temperaturpunkt für das PS II (Lazár und Ilík 1997).

Es wurden verschiedene europäische Baumarten miteinander verglichen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der natürlichen Sukzession auftreten. Die Untersuchung sollte Aufschluß darüber geben, ob es eine Korrelation zwischen der Stellung der Bäume im Ablauf der Sukzession und der Toleranz ihres Photosyntheseapparates gegenüber starker Erwärmung gibt (Abb. 6).

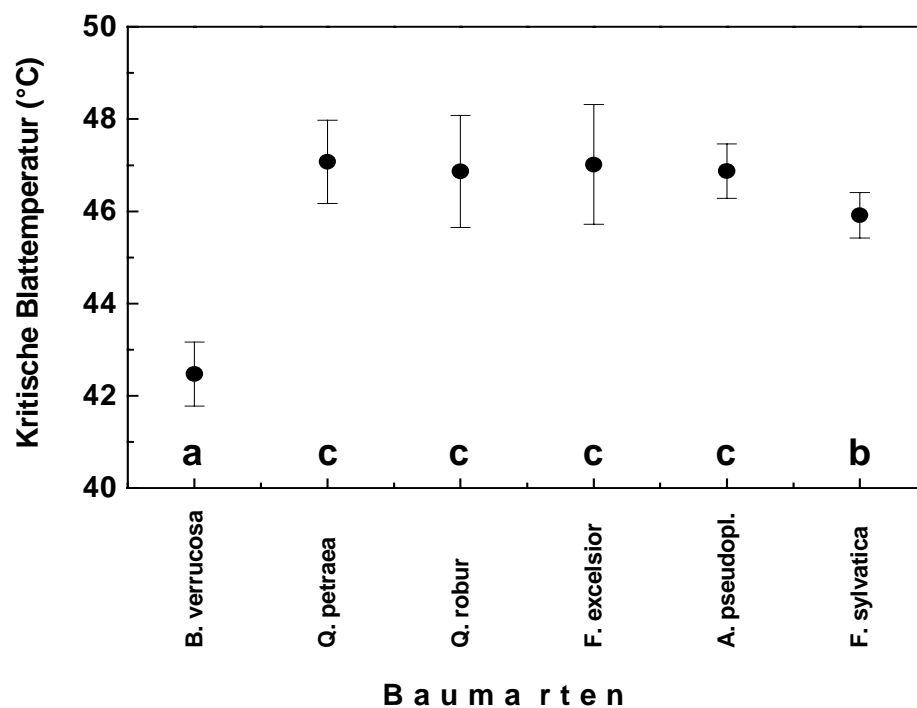


Abb. 6: Kritische Temperaturen von PS II in Blättern von Birke, Traubeneiche, Stieleiche, Esche, Bergahorn und Buche. Die Messungen erfolgten wie in Abbildung 5 beschrieben. Unterschiedliche Buchstaben geben signifikante Unterschiede mit $P \leq 0.05$ an. $n = 9 \pm SD$. Die Pflanzen wurden vor dem Versuch optimal gewässert und über Nacht an eine Temperatur von 20°C und Dunkelheit angepaßt.

Deutliche Unterschiede zeigten sich zwischen den Baumarten, die in Abb. 6 nach steigender Schattentoleranz geordnet sind. Birke zeigte die geringste Toleranz gegenüber Hitze. Bereits bei $42.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$ war der kritischer Punkt ihres PS II erreicht, der bei der

Buche bei $45.9 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, bei den anderen Baumarten zwischen 46.8 und 47.1°C lag (Abb. 6).

Schlußfolgerung: Eine Korrelation zwischen dem kritischen Temperaturpunkt des PS II und der Stellung der Baumart in der natürlichen Sukzessionsfolge konnte nicht beobachtet werden. PS II der Birke war signifikant weniger tolerant gegenüber hohen Temperaturen als alle anderen untersuchten Baumarten. Damit kann angenommen werden, daß die Birke dem Hitzestreß ausweicht, indem sie durch hohe Transpirationsraten ihre Blattemperatur senkt. Als weitere Strategie der Streßvermeidung bei der Birke kann vermutet werden, daß ihre Blätter an den dünnen Blattstiele mit jedem Luftzug schwanken und damit die Blattstellung wechselt.

III. 3 Erholung nach Photoinhibition

Photoinhibition kann reversibel („dynamisch“) und irreversibel („chronisch“) sein. Reversible Photoinhibition beruht auf einer „Überreduktion“ des PS II und bedeutet, daß Elektronen auf der Donorseite schneller produziert werden als an der Akzeptorseite abgenommen werden. Dies erfordert eine Herabsetzung des Elektronentransportes oder zunehmende Reduktion alternativer Akzeptoren wie zum Beispiel O_2 . Irreversible Schädigungen sind nur bei dauerhaftem Streß, bei niedrigen Temperaturen oder extrem hohen Temperaturen zu erwarten. Sie beruhen häufig auf einem verstärktem Abbau von D_1 -Proteinen oder auf Schädigungen des Elektronenakzeptors Q_A im PS II (Osmond und Grace 1995). In der Folge werden Chlorophylle und Carotinoide zerstört, und das Blatt bleicht aus (Osmond und Grace 1995).

Da beobachtet wurde, daß das Photosystem II der Birke bei niedrigeren Temperaturen geschädigt wird als das der Buche (Abb. 5), war es interessant zu wissen, ob die Schäden, die im PS II auftreten, reversibel oder irreversibel sind. Da die Birke ein ungebundenes Wachstum aufweist und damit Blätter schneller ersetzen kann als die Buche, wurde vermutet, daß die Blatterhaltung für die Birke weniger bedeutsam ist als für die Buche und daher eher zu irreversiblen Schäden neigt.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden Buchen und Birken wie in Abbildung 4 beschrieben bei unterschiedlichen Temperaturen von 10 bis 40°C akklimatisiert und Blätter

für 10 Minuten mit Starklicht ($>2500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bestrahlt und anschließend abgedunkelt. Nach dieser Behandlung zeigten beide Baumarten Anzeichen von Photoinhibition. In Abb. 7 wird die Dauer der Erholungsphase nach Photoinhibition für die beiden Baumarten in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur dargestellt. 10 Minuten nach Abschalten des Lichtes erreichten beide Baumarten konstante Werte für ϕ_{PSII} (Abb. 7). Im Vergleich mit Abb. 4 (A und C) zeigte sich, daß die Buche bei 35°C Umgebungstemperatur deutlich niedrigere Werte (0.450 statt 0.810) als Endwert erreichte (Abb. 4 A, Abb. 7, 35°C). Nach der photoinhibitorischen Behandlung bei 40°C lag ϕ_{PSII} bei der Buche um 45% unter dem Wert, der ohne vorherige photoinhibitorische Behandlung beobachtet wurde (Abb. 4 A, Abb. 7).

Die Elektronentransportrate der Birke erholte sich bei 10°C Umgebungstemperatur nach Photoinhibition nicht mehr vollständig (Abb. 7, 10°C) und erreichte Werte, die um 25 % unter dem Optimalwert von ϕ_{PSII} lagen (Abb. 4 C). Bei Umgebungstemperaturen von 20 und 28°C wurde 10 Minuten nach Abschalten des Lichtes eine Erholung des Photosyntheseapparates beobachtet (Abb. 7). Bei 35°C lagen die Werte von ϕ_{PSII} auch nach 30 Minuten Abdunkelung um 40 % unter dem Optimalwert (Abb. 7, 35°C). Bei 40°C Umgebungstemperatur erholte sich der Photosyntheseapparat der Birke nicht mehr. Bei dieser Umgebungstemperatur stieg der mittlere Wert für ϕ_{PSII} innerhalb von 30 Minuten nach Abschalten des Starklichtes nicht über 0.150 (Abb. 7).

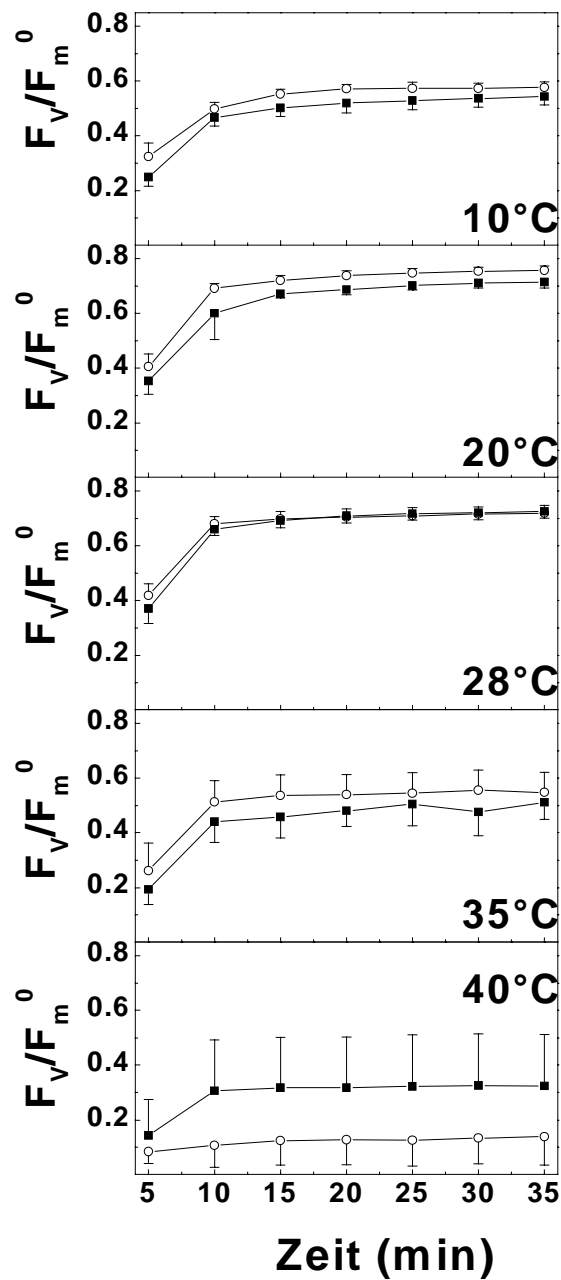


Abb. 7: Erholungsphase der Elektronentransportkapazität (F_v)/ F_m im Anschluß an Photoinhibition bei verschiedenen Temperaturen. Buchen und Birken wurden 3 Tage lang bei der angegebenen Umgebungstemperatur gehalten (16 Stunden Licht am Tag, $300 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ PAR). Im Anschluß wurden sie 10 Minuten lang mit kaltem Licht gestreift ($\text{PPFD} > 2500 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$), anschließend wurde (F_v)/ F_m alle 5 Minuten über einen Zeitraum von 30 Minuten gemessen. \square : Birke, \blacksquare : Buche. $n=5 \pm \text{SD}$. Zwischen den Messungen wurde das Blatt vollständig abgedunkelt.

Schlußfolgerung: Die Birke ist empfindlicher als die Buche gegenüber dem durch Photoinhibition hervorgerufenen Streß in Verbindung mit Temperaturen um 10°C und über 30°C. Es ist zu vermuten, daß die Birke dem Streß zu hoher Temperaturen vor allem durch eine Senkung der Blattemperatur ausweicht. Dieser Ausweichmechanismus scheint effektiv zu sein und im Normalfall eine hohe photosynthetische Kapazität selbst bei drastischen Änderungen der Lichtbedingungen aufrecht zu erhalten (Abb. 4 C, D). Die Buche ist aufgrund ihres determinierten Wachstums nicht in der Lage, geschädigte Blätter schnell zu ersetzen. Streß durch hohe Temperaturen, die direkt auf das Blatt wirken, bewirkt ebenso wie Starklicht eine Senkung von Φ_{PSII} . Diese Reaktion ist jedoch im Gegensatz zu der von Birken deutlich schneller reversibel.

VI. Langzeitanpassung von Buchenblättern an unterschiedliche Lichtbedingungen

Bei der Buche können lichtexponierte Blätter und Blätter aus dem Bestandesinneren anatomisch (Eschrich et al. 1989) und physiologisch (Peltzer et al. 1999a) unterschieden werden. Da Lichtblätter häufig einer sehr hohen Strahlung ausgesetzt sind, besitzen sie im allgemeinen höhere Nettphotosyntheseraten (NPS) als Schattenblätter (Tognetti et al. 1997). Eine höhere NPS kann jedoch auch mit einer höheren oxidativen Belastung verbunden sein. Das sollte insbesondere dann der Fall sein, wenn die auf das Blatt treffende Strahlung höher ist als der Lichtsättigungspunkt. Regelmäßig auftretender oxidativer Streß müßte zu einer erhöhten antioxidativen Kapazität führen, die sich auch in einer höheren Streßtoleranz gegenüber anderen Streßfaktoren äußern sollte. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit 3jährige Buchen 3 Jahre lang unter Schattierungsnetzen gehalten (10% PAR) oder ohne Schattierungsnetz. Anschließend wurde in Licht- und Schattenblättern Photosynthese und Chlorophyllfluoreszenz gemessen und physiologische Parameter erhoben. Eine Untersuchung mit Methylviologen, einem Herbizid, das oxidativen Streß erzeugt, sollte zeigen, ob Lichtblätter toleranter gegenüber oxidativem Streß sind als Schattenblätter.

Lichtblätter zeigten in der vorliegenden Arbeit einen Lichtkompensationspunkt von etwa $25 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ PAR (Abb. 8). Die maximale NPS wurde in Lichtblättern bei $450 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und höheren Lichtintensitäten beobachtet. Sie betrug etwa $9 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Abb. 8). Ähnliche Werte wurden von Tognetti et al. (1997) und Tognetti et al. (1998) in

Lichtblättern einjähriger Buchen gemessen (6 und $8 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Schattenblätter zeigten in der vorliegenden Arbeit ihre maximale CO_2 -Fixierung (bis $3 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) bei Lichtintensitäten von etwa $200 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ PAR und höher (Abb. 8). In einjährigen Buchen verschiedener italienischer Herkünfte wurden an Schattenblättern geringere NPS gemessen, die zwischen 1 und $2 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ lagen (Tognetti et al. 1997, Tognetti et al. 1998). Der Lichtkompensationspunkt der Schattenblätter wurde in der vorliegenden Arbeit bei etwa $14 \mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ beobachtet (Abb. 8).

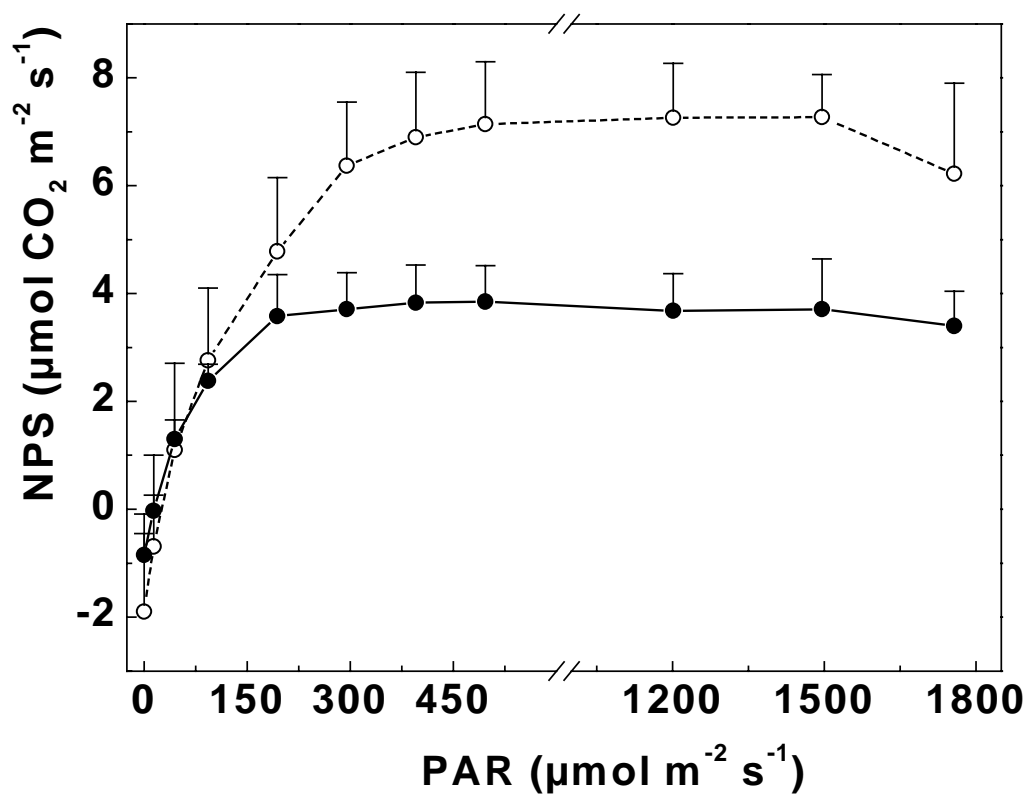


Abb. 8: *Nettophotosyntheseraten von Licht- und Schattenblättern 6jähriger Buchen, in Abhängigkeit vom Licht. Die Pflanzen wuchsen unter Schattierungsnetzen auf (ca. 10% PAR, —) und ohne Schattierung (100% PAR,).*

Licht- und Schattenblätter der Buche unterschieden sich entsprechend ihrer photosynthetischen Anpassung an Licht. Dies zeigte sich auch in signifikant höheren

Proteingehalten und Blattgewichten in Lichtblätter als in Schattenblättern (Tab. 1). Neben 25 bis 75 % niedrigeren Aktivitäten antioxidativer Enzyme, weisen Schattenblätter höhere Gehalte an Gesamtchlorophyll als Lichtblätter und geringere Mengen an Chlorophyll b auf, entsprechend ein niedrigeres Verhältnis zwischen Chlorophyll a und Chlorophyll b (Tab. 1). Ähnliche, wenngleich weniger deutliche Unterschiede in den Chlorophyllgehalten in Licht- und Schattenblättern der Buche beobachteten García-Plazaola und Becerril (2000). Mit der Anpassung an Licht war offenbar neben der Notwendigkeit, die Pigmentgehalte zu erhöhen, auch die Anpassung des antioxidative Systems verbunden (Tab. 1).

Tab. 1: Blattgewichte, Protein- und Pigmentgehalte sowie Aktivitäten antioxidativer Enzyme in Licht- und Schattenblättern der Buche im Vergleich. Die Proben wurden am 24.7.1997 geerntet. Die Ascorbatdaten wurden in Licht- und Schattenblättern der Buche gemessen, die am 21.8.2000 geerntet wurden. APX: Ascorbatperoxidase, DAHR: Dehydroascorbatreduktase, MDAR: Monodehydroascorbatradikalreduktase, GR: Glutathionreduktase. $n = 3$, unterschiedliche Buchstaben geben signifikante Unterschiede mit $P \leq 0.05$ an. Methoden: siehe Peltzer et al. 1999.

	Schattenblätter	Lichtblätter	P
Blattgewicht (g m^{-2})	52.7 ± 3.3 a	115.1 ± 23.5 b	0.0019
TM FM^{-1}	0.35 ± 0.03 a	0.46 ± 0.03 b	0.0020
Proteine (mg g^{-1} FM)	17.8 ± 3.8 a	27.8 ± 3.8 b	0.0093
Chlorophyll a (mg g^{-1} FM)	1.30 ± 0.15 b	0.64 ± 0.05 a	0.0002
Chlorophyll b (mg g^{-1} FM)	0.67 ± 0.08 b	0.14 ± 0.03 a	0.0002
Carotinoide (mg g^{-1} FM)	0.57 ± 0.08 b	0.33 ± 0.03 a	0.0007
Chl. a Chl. b ⁻¹	2.82 ± 0.15 a	4.72 ± 0.85 b	0.0046
Chlorophyll (a+b)Carotinoide ⁻¹	3.11 ± 0.07 b	2.68 ± 0.05 a	0.0001
Ascorbat ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FM)	4.3 ± 1.2 a	12.8 ± 1.1 b	0.0000
Gesamtascorbat ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FM)	6.1 ± 1.1 a	17.6 ± 1.8 b	0.0000
APX (nkat g^{-1} FM)	106.7 ± 42.0 a	433.5 ± 144.6 b	0.0049
MDAR (nkat g^{-1} FM)	16.8 ± 7.4 a	38.8 ± 12.5 b	0.0233
DHAR (nkat g^{-1} FM)	1.5 ± 0.3 a	4.2 ± 1.3 b	0.0068
GR (nkat g^{-1} FM)	16.6 ± 1.8 a	39.8 ± 7.8 b	0.0011

Einige Autoren zeigten, daß Lichtblätter der Buche abhängig von der Jahreszeit bis zu 20 μmol Gesamtascorbat pro Gramm Frischgewicht enthalten können (Luwe 1996, Polle und Morawe 1995). In eigenen Untersuchungen wurden im August 2000 in Lichtblättern geringere Werte etwa sechsjähriger Buchen von einer Versuchsfläche in den Nähe des Forstbotanischen Institutes in Göttingen gemessen ($12.8 \pm 1.1 \mu\text{mol g}^{-1}$ FM, Tab. 1). Dies entsprach etwa dem dreifachen Wert dessen, was in Schattenblättern gemessen wurde (10% PAR im Freiland unter Schattierungsnetz, unveröffentlichte Daten). In beiden Blatttypen lag Dehydroascorbat zu etwa 30% am Gesamtascorbat vor (Tab. 1).

Um zu prüfen, ob lichtangepaßte Buchenblätter aufgrund höherer Aktivitäten antioxidativer Enzyme und höherer Ascorbatkonzentrationen als in Schattenblättern auch eine höhere Entgiftungskapazität aufwiesen, wurden sie mit Methylviologen inkubiert. Methylviologen ist ein Herbizid, das oxidativen Streß induziert, indem es Elektronen am PS I aufnimmt, Radikale bildet, die über die Reduktion von O_2 zu $\text{O}_2^{\bullet-}$ wieder oxidiert werden. Als Folge zeigen Blätter, die mit Methylviologen inkubiert werden, zunehmende Membranschäden. Diese können nachgewiesen werden durch den Ionenaustritt, der zu einer Erhöhung der Leitfähigkeit in der Lösung führt, in denen die Blattscheiben schwimmen.

Trotz unterschiedlicher Ausstattung mit Entgiftungssystemen (Tab. 1) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Licht- und Schattenblättern beobachtet (Abb. 9). In einem Fall wurde sogar eine höher Toleranz von Schattenblättern als von Lichtblättern gefunden (Peltzer et al. 1999a). Dies widerspricht der Annahme, daß Lichtblätter besser vor einer Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies geschützt sind als Schattenblätter.

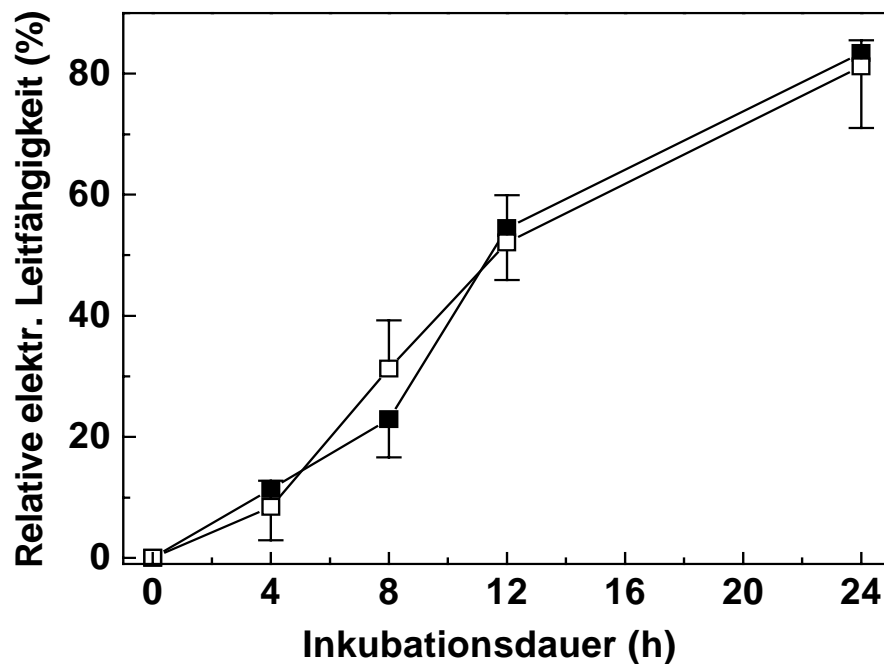


Abb. 9: Zunahme an Membranschäden durch Inkubation mit Methylviologen. Vergleich zwischen Lichtblättern (□) und Schattenblättern (■). Blattscheiben ($n=9$) wurden in einer 4 mM Methylviologenlösung bei einer Belichtung von $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ inkubiert. Die übrigen Versuchsbedingungen waren wie in (Peltzer et al. 1999a) beschrieben. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Blatttypen gefunden ($P=0.1408$). Die Proben wurden am Hengstberg (Nähe Göttingen) geerntet.

Aufgrund der besseren Lichtnutzung von Lichtblättern könnte die Ursache für die ähnliche Streßempfindlichkeit von Lichtblättern und Schattenblättern darin liegen, daß bei gleicher Belichtung in Lichtblättern relativ mehr reduzierende Äquivalente gebildet werden als in Schattenblättern. Die Zahl der Elektronen, die pro Mol CO_2 -Fixierung durch das PS II fließen, läßt sich nach Genty et al. (1989) anhand des Ausdruckes ϕ_{PSII} und NPS bestimmen:

$$(2) k = (F_v' / F_m' \times I_i) / (\text{NPS} \times I_a)^{-1}$$

Dabei ist I_i die auf das Blatt treffende Strahlung (PAR) und I_a der Anteil dieser Strahlung, der zur Anregung von PS II beiträgt. Dieser Anteil wurde gleich 0.5 gesetzt, unter der Annahme, daß das Licht von PS I und PS II zu gleichen Teilen genutzt wird.

Stöchiometrisch werden 4 Mol Elektronen zur Assimilation von 1 Mol CO_2 benötigt. Während in Schattenblättern etwas mehr als doppelt so viele Elektronen maximal zur Assimilation eines Mols CO_2 durch das PS II fließen, wurden in Lichtblättern maximal Werte gemessen, die um bis zu 600% darüber lagen (Abb. 9). Die Elektronenflußraten waren im Bereich von 90 bis $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei jeder Lichtintensität signifikant höher als in Schattenblättern ($P \leq 0.05$). Das bedeutet, daß in Lichtblättern ein höherer oxidativer Streß zu erwarten ist als in Schattenblättern, wenn die Elektronen statt für die CO_2 -Assimilation durch das Herbizid Methylviologen vor allem O_2 zu $\text{O}_2^{\bullet-}$ reduzieren.

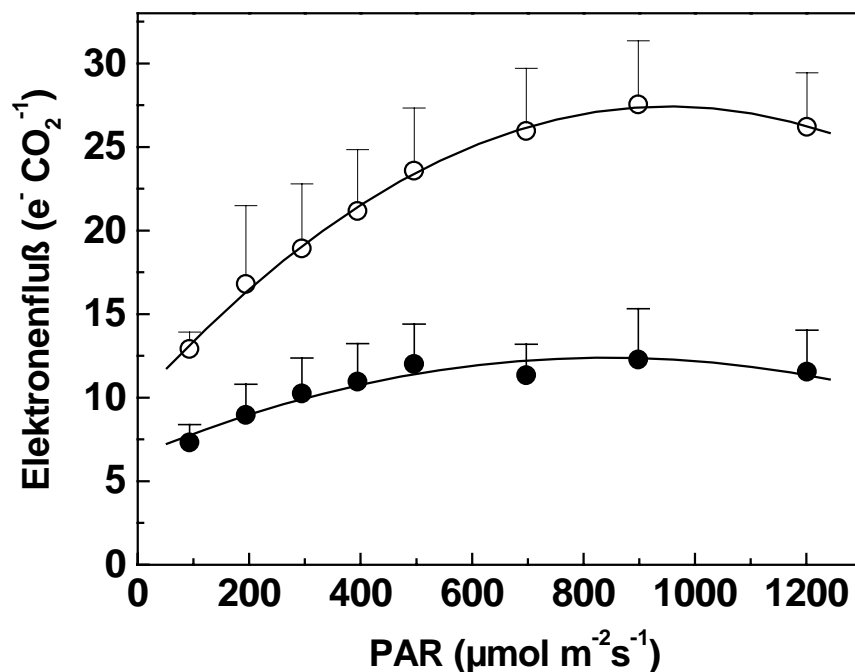


Abb. 10: Elektronenflußraten durch PS II in Licht- und Schattenblättern 6jähriger Buchen in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Die Pflanzen wuchsen unter Schattierungsnetzen auf (bei 10% des normal auftretenden PAR, ●) und ohne Schattierung (100% des normal auftretenden PAR, ○). Die Daten berechneten sich aus den Werten aus Abb. 8 und Fluoreszenzmessungen vom 14. und 17.8.2000. Den Daten wurden sigmoide Kurven angepaßt.

Neben den hier beschriebenen Untersuchungen zum Einfluß von Licht, wurde die Streßresistenz der Buche auch unter weiteren geänderten Umweltbedingungen geprüft, wie der Stickstoffverfügbarkeit, der Basensättigung des Bodensubstrates und erhöhtem CO₂. Es ist bekannt, daß diese Umweltfaktoren die antioxidative Kapazität verändern (Schwanz et al. 1996, Schwanz und Polle 1998, Polle et al. 2000). Es wurde untersucht, ob außerdem auch die Streßresistenz verändert war. Dazu wurden Buchenblätter wie zuvor beschrieben (Abb. 9) Methylviologen ausgesetzt. Das Material stammte aus Open-top Kammern, in denen Buchen ambienten und erhöhten CO₂-Konzentrationen, saurem und basischem Bodensubstrat, einer erhöhten Stickstoffdüngung und keiner Stickstoffdüngung ausgesetzt waren und wurden auf ihre Streßresistenz getestet (Polle et al. 2001). Dabei wurde eine signifikante höhere Toleranz der Buchenblätter gegen oxidativen Streß beobachtet, die auf basischem Boden wuchsen. Weder hohe Stickstoffgaben noch erhöhte CO₂-Konzentrationen trugen zu einer höheren Toleranz bei (Polle et al. 2001). Die Ergebnisse lassen eher darauf schließen, daß Buchen auf sauren Standorten mit hohen Stickstoffeinträgen anfälliger gegenüber zusätzlich auftretendem Streß sind.

Schlußfolgerung: Chronischer Lichtstreß führte in Lichtblättern der Buche zu höheren Aktivitäten antioxidativer Enzyme und höheren Konzentrationen an Ascorbat als in Schattenblättern (Tab. 1). Die höhere photosynthetische Kapazität der Lichtblätter gegenüber den Schattenblättern (Abb. 8) war gleichzeitig mit einer höheren Effizienz der Elektronennutzung für die Assimilation von CO₂ verbunden (Abb. 10). Unter Methylviologen-induziertem oxidativem Streß führte die bei allen Lichtintensitäten höhere Elektronentransportrate in den Lichtblättern im Vergleich zu den Schattenblättern zu einer höheren oxidativen Belastung. Es ist anzunehmen, daß das die Ursache dafür war, daß Lichtblätter sich nicht als resistenter gegenüber oxidativem Streß erwiesen als Schattenblätter (Abb. 9).

VII. Temperaturabhängigkeiten antioxidativer Enzyme in photosynthetisch aktiven und inaktiven Geweben von *Fagus sylvatica* (L.) und *Coleus blumei* (Benth.)

Eine Reihe von Autoren berichten, daß Streß durch Kälte, Hitze oder Starklicht sowie Kombinationen aus temperaturbürtigem Streß mit Starklicht eine Erhöhung antioxidativer Enzyme (Foyer und Mullineaux 1994, Foyer et al. 1994, Polle und Rennenberg 1993) oder eine Erhöhung der Konzentrationen an Ascorbat und Glutathion bewirken (Ye et al. 2000).

Unter Freilandbedingungen wurden auffällige Fluktuationen antioxidativer Systeme beobachtet (Schupp und Rennenberg 1988, Badiani et al. 1993, Polle und Morawe 1995, Peltzer und Polle 2001). Unter kontrollierten Bedingungen führten extrem hohe Lichtintensitäten in nicht angepaßten Pflanzen (*Arabidopsis*) zu einer starken Zunahme der Konzentrationen an H_2O_2 und einem starken Anstieg der mRNA der cytosolischen APX Isoenzyme (Karpinski et al. 1997). Ob die Aktivitäten antioxidativer Enzyme entsprechend der jeweiligen Lichtintensitäten angepaßt werden, ist unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, Streßantworten auf Licht und Temperatur zu unterscheiden und photosyntheseabhängige und –unabhängige Streßantworten zu trennen. Dazu wurden Buchen als streßtolerante und Buntnesseln als streßsensitive Pflanzen miteinander verglichen. Die Enzymaktivitäten wurden bei den Temperaturen im Test gemessen, denen das Blatt zum Zeitpunkt der Ernte ausgesetzt war. Dabei wurde beobachtet, daß die Aktivität der APX bei den niedrigen Temperaturen (10°C) am höchsten war und Licht diese Reaktion verstärkte (Peltzer et al. 2001). Im Gegensatz zur APX wurde die Aktivität der GR durch hohe Temperaturen erhöht, wobei Licht diese Reaktion ebenfalls verstärkte (Peltzer et al. 2001). In beiden Fällen ist fraglich, ob die photosynthetische Aktivität an sich für die Lichtreaktion notwendig war, da die Aktivitäten der GR und APX in grünen wie in weißen Blatteilen der Buntnessel etwa gleich hoch waren (Peltzer et al. 2001). Die Aktivität der MDAR wurde bei niedrigen Temperaturen eher geringer und zeigten keinen klaren Temperatureffekt (Peltzer et al. 2001). In beiden untersuchten Arten waren die Ascorbat- und Glutathionkonzentrationen bei hohen Temperaturen höher als bei niedrigen (Peltzer et al. 2001). Offensichtlich war das Vorhandensein eines funktionellen Photosyntheseapparates notwendig, um die Ascorbatkonzentrationen hoch zu halten. Weiße Blattbereiche der Buntnessel wiesen nicht nur signifikant niedrigere Ascorbatkonzentrationen, sondern auch einen höheren Anteil an DHA auf. Im Gegensatz zu dieser Beobachtung verursachte Dunkelheit keine signifikante

Abnahme an AA in Buchenblättern. Möglicherweise waren die Änderungen jedoch so gering, daß sie aufgrund der insgesamt hohen Konzentrationen an AA in Buchenblättern nicht gemessen werden konnten. Obgleich die Glutathionkonzentrationen in Buntnesselblättern allgemein niedriger waren als in Buchenblättern, waren die Veränderungen geringer als die von Ascorbat. Eine photosynthetische Aktivität war für den Erhalt von Glutathion nicht notwendig (Peltzer et al. 2001).

Wie bereits in einiger vorherigen Untersuchungen gezeigt wurde (Lee DH und Lee CB 2000: *Cucumis sativus*, Hong-Xu et al. 1999: *Plantago major*, Badiani et al. 1997: *Sorghum bicolor*, Leipner et al. 1997: *Zea mays*, Brüggemann et al. 1999: *Lycopersicon esculentum*), beruhte die kurzfristige Anpassung von Buchen und Buntnesseln an niedrige Temperaturen auf einer Zunahme der Aktivitäten der APX und der SOD, aber nicht der Aktivitäten der GR. Eine Anpassung an hohe Temperaturen zeigte sich an einem Anstieg der GR Aktivitäten und höheren Konzentrationen an AA und GSH. Diese Beobachtung, die auf eine Zunahme nichtenzymatischer Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies bei hohen Temperaturen hinweist, deckt sich weitgehend mit den Daten, die an Hirse erhoben wurden (Badiani et al. 1997).

Auf der Basis von Frischgewicht enthielten Buchenblätter höhere Konzentrationen an Antioxidantien als Buntnesseln, abgesehen von der SOD. Allerdings, auf der Basis von Chlorophyll- oder Proteingehalten enthielt *Coleus* ähnliche oder sogar höhere Konzentrationen an Antioxidantien. Daher kann ein einfacher Zusammenhang zwischen den Konzentrationen an Antioxidantien in photosynthetischen Geweben und Streßtoleranz, nicht hergestellt werden. Jedoch zeigte sich, daß die empfindlichere Buntnessel bei hohen Temperaturen keine meßbaren Aktivitäten der APX aufwies, während bei niedrigen Temperaturen die Aktivität der GR stark gesenkt war. Bei hohen Temperaturen ist der auffälligste Unterschied zwischen den beiden Arten, daß in der Buntnessel die APX empfindlicher war als die APX in der Buche. Während sie bei 25°C noch meßbar war, konnte bei 35°C im Test keine Aktivität mehr beobachtet werden.

Bei niedrigen Temperaturen zeigte sich ein anderes Muster: beide Arten schienen nach einer Anpassung an 10°C eine noch ausreichend hohe Aktivitäten der GR aufzuweisen, wenn die Enzymaktivität bei 25°C gemessen wurde. Allerdings sanken die Aktivitäten der GR stark, wenn sie bei 10°C bestimmt wurden. In *Coleus* war diese Abnahme höher als in der Buche und korrelierte entsprechend mit einem Verlust an GSH und einem signifikanten Anstieg an GSSG. Wie Foyer et al. (1995) an Pappeln zeigten, haben die GR und GSH eine wichtige Funktion bei der Anpassung an niedrige Temperaturen. Das wurde auch an

transgenen, kälteempfindlichen und kälteunempfindlichen Pflanzen gezeigt (Fadzillah et al. 1996).

Es kann eher vermutet werden, daß die geringere Temperaturtoleranz der Buntnessel daraus resultierte, daß einzelne Komponenten des antioxidativen Systems versagten.

Schlußfolgerung: Die Untersuchungen zeigten, daß kurzfristige Veränderungen des antioxidativen Systems aufgrund von schwankenden Temperaturen erfolgten, die durch Licht noch verstärkt werden konnten. Diese Reaktionen scheinen nicht „ausbalanciert“ zu sein, so daß sie zum Versagen des antioxidativen Systems des Ascorbat-Glutathion-Zyklus führten. Wenn die Aktivität der APX sich im Blatt genauso verhält wie im Test, ist es wahrscheinlich, daß Buntnesselblätter bei hohen Temperaturen infolge des APX-Verlustes mit hohen Konzentrationen an H_2O_2 vergiftet werden. Das würde eine Inhibition des Calvinzyklus zur Folge haben (Kaiser 1979) und damit der CO_2 -Assimilation. Als Folge müßte der photosynthetische Elektronentransport herunterreguliert werden. Dies wird durch eigene Untersuchungen belegt (Peltzer und Polle 2001). Erhöhte Konzentrationen an H_2O_2 hätten außerdem bei fehlender Kompensation eine oxidative Degradation zur Folge. In der Buche war das antioxidative System über den gesamten Temperaturbereich wesentlich stabiler als das der Buntnessel. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß wahrscheinlich die höhere Thermotoleranz der Enzyme und nicht so sehr ihre absoluten Aktivitäten für die Streßanpassung von Bedeutung sind.

VIII. Untersuchungen zur Ascorbatsynthese

In Blättern von Buche und Buntnessel wurden höhere Ascorbatkonzentrationen bei hohen Temperaturen (35°C) als bei niedrigen Temperaturen (10°C) gemessen (Peltzer et al. 2001). In Buntnesseln wurden signifikant höhere Ascorbatkonzentrationen in grünen Blatteilen als in weißen Blatteilen beobachtet. In den grünen Blattabschnitten wurde mehr Ascorbat bei 35°C als bei 10°C Umgebungstemperatur während der Ernte bestimmt (Peltzer et al. 2001). Es wurde vermutet, daß die erhöhten Ascorbatkonzentrationen auf eine erhöhte Synthese von Ascorbat zurückzuführen waren.

Um zu überprüfen, ob die Ascorbatsynthese in Buntnesseln abhängig ist von photosynthetischer Aktivität im Blattgewebe oder von Licht, wurde ein Schlüsselenzym der Ascorbatsynthese, die GalDH (Pallanca und Smirnof 1999) untersucht. Buntnesseln

wurden im Licht und im Dunkeln geerntet und die Aktivität der GalDH in grünen und weißen Blattbereichen getrennt gemessen. In grünen wie auch in weißen Blattbereichen wurden höhere Aktivitäten der GalDH in belichteten Blättern beobachtet als in unbelichteten Blättern. Die GalDH, zeigte fast doppelt so hohe Aktivitäten in weißen Blatteilen wie in grünen (bezogen auf Proteingehalte) (Peltzer et al. 1999). Auf Frischgewicht bezogen, korrelierten die Aktivitäten dieses Enzyms mit den Ascorbatkonzentrationen (Peltzer et al. 1999) in den jeweiligen Blatteilen. Wenn die Temperatur im Test verändert wurde, wurde in grünen, belichteten Blättern eine höchste Aktivität des Enzyms bei 25°C beobachtet, während sie bei den anderen Versuchsbedingungen dieses Optimum bei 30°C noch nicht erreicht hatte (Peltzer et al. 1999).

Schlußfolgerung: Die Korrelation zwischen den Ascorbatkonzentrationen und den Aktivitäten der L-GalDH in grünen und weißen Blatteilen der Buntnessel unterstützt die Hypothese von Smirnof und Pallanca (1999), daß dieses Enzym an der Ascorbatsynthese beteiligt ist. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist die Ascorbatsynthese lichtabhängig (auf die Blattfläche bezogen), aber nicht abhängig von einem funktionierenden Photosyntheseapparat. Da dieses Enzym in belichteten grünen Blattabschnitten eine andere Reaktion auf unterschiedliche Temperaturen bei den Messungen zeigte als im Dunkeln und in weißen Blattbereichen bei Belichtung, ist es möglich, daß eine photosynthetische Aktivität die Aktivität der L-GalDH beeinflusst. Es könnten aber auch unterschiedliche Isoenzyme in grünen und weißen Blattbereichen aktiv sein.

IX. Reaktionen des antioxidativen Systems in Buchenblättern (*Fagus sylvatica*) auf unterschiedliche Licht- und Temperaturbedingungen im Freiland

Im Freiland sind die Umweltbedingungen komplexer als bei den vorherigen Untersuchungen, bei denen Temperatur, Licht und Luftfeuchte in Klimakammern kontrolliert wurden. Außerdem wurden die Pflanzen ausreichend gewässert und im Laufe ihrer gesamten Entwicklung optimal mit Nährelementen versorgt. Neben den mikroklimatischen Bedingungen kommen im Freiland noch der UV-Anteil im Licht dazu und mögliche Belastungen durch Luftschadstoffe. Ziel der vorliegenden Untersuchungen

war es, zu prüfen ob im Freiland eine Abhängigkeit des antioxidativen Systems der Buche von Licht und Temperatur beobachtet werden kann.

Diurnal über den Verlauf mehrerer Tage gemessenen Aktivitäten der APX, MDAR und GR zeigten hohe Schwankungen insbesondere bei den Aktivitäten der APX und der MDAR. Ähnlich wie unter kontrollierten Bedingungen waren die Aktivitäten der APX und der MDAR in erster Linie mit der Temperatur korreliert (Peltzer und Polle 2001). Es existierte auch eine schwächere Korrelation mit Licht. Diese ist vor allem darauf zurückzuführen, daß Licht und Temperatur im Freiland eine positive Korrelation aufweisen. Die GR in Buchenblättern zeigte im Freiland weder eine Abhängigkeit von Licht noch von der Temperatur, während sie bei Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen deutlich niedrigere Aktivitäten in Buchenblättern bei 35°C als bei 10°C zeigten (Peltzer et al. 2001). Jedoch wurden die Enzymaktivitäten dieser drei Enzyme nur unter Standardbedingungen (25°C im Test) gemessen.

An einem sonnigen Sommertag wurden signifikant höhere Ascorbatkonzentrationen um 14.00 Uhr gemessen als morgens und abends, gleichzeitig stieg der prozentuale Anteil an DHA ($P \leq 0.05$). Zum Abend fielen diese Werte wieder ab. Der Ascorbatspiegel nahm bereits ab, als noch minimale Werte für ϕ_{PSII} um 0.2 gemessen wurden (Peltzer und Polle 2001). Erhöhte Ascorbatkonzentrationen wurden in der Klimakammer aber auch bei Temperaturerhöhungen beobachtet. Hier zeigten Buchenblätter signifikant erhöhte Ascorbatkonzentrationen bei 35°C gegenüber denen, die bei 10°C wuchsen (Peltzer et al. 2001). Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Badiani et al. (1997) in Hirse reagierten Lichtblätter der Buche auf akuten Streß im Freiland (Licht, Hitze, eventuell Wassermangel) kurzfristig mit einer Erhöhung der Ascorbatkonzentrationen, aber nicht mit einem gleichzeitigen Anstieg der Aktivitäten antioxidativer Enzyme.

Schlußfolgerungen: Die Reaktion des antioxidativen Systems auf Licht- und Temperaturstreß ergibt sich aus einem Zusammenspiel zwischen enzymatischen und nichtenzymatischen Komponenten. Berechnet man anhand der gemessenen Werte von ϕ_{PSII} die gesamte Elektronentransportrate, stieg im Freiland der Elektronentransport von 16 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ am Morgen bis auf 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ am Nachmittag, obgleich ϕ_{PSII} von 0.81 auf etwa 0.2 heruntergeregelt wurde. CO_2 -Assimilationsraten der Buche liegen unter 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (siehe Abschnitt VI). Das würde einem Bedarf an 80 $\mu\text{mol Elektronen m}^{-2} \text{s}^{-1}$

entsprechen. Damit müßte an unbewölkten Tagen im Freiland etwa ein Drittel der Elektronen in andere Prozesse als die CO₂-Assimilation abgeleitet werden. Dies wäre der durch antioxidative Mechanismen maximal zu entgiftende Anteil. Bieler und Fock (1996) berichteten, daß unter Streßbedingungen bis zu 30% der im Photosyntheseapparat transportierten Elektronen in die Produktion von O₂^{•-} fließen können. Wird dieser schlimmste Fall angenommen, wären Aktivitäten der APX von mindestens 20 µmol m⁻² s⁻¹ notwendig, um die auftretende Belastung an H₂O₂ zu kompensieren. In der vorliegenden Untersuchung wurden an sonnigen Tagen Enzymaktivitäten der APX von 220 nkat g⁻¹ Frischgewicht beobachtet, was auf die Blattfläche umgerechnet eine Aktivität von etwa 20.2 µmol m⁻² s⁻¹ ergibt. Dies wäre ausreichend, um eine Akkumulation von H₂O₂ zu vermeiden.

X. Zusammenfassung

Ungünstige Umweltbedingungen können in aeroben Organismen oxidativen Streß auslösen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß von Licht und Temperatur auf das antioxidative System der Buche (*Fagus sylvatica*) zu untersuchen, da bisher wenig bekannt ist, welche Toleranzgrenzen die Buche gegenüber Veränderungen der Umweltbedingungen aufweist. Parallel dazu wurde die Nettophotosynthese durch Gaswechsel- und Chlorophyllfluoreszenz charakterisiert. Bei der Untersuchung des Ascorbat-Glutathion-Zyklus und der photosynthetischen Kapazität der Pflanzen wurde zwischen kurz- und langfristigen Anpassungsmechanismen unterschieden.

Um die Rolle von Licht und Temperatur im Hinblick auf oxidativen Streß besser zu verstehen, wurden im Vergleich zur Buche die Birke (*Betula verrucosa*) und eine grün-weiß panaschierte Form der Buntnessel (*Coleus blumei*) untersucht. Die Buche ist eine „Klimaxbaumart“, die sowohl Blätter, die an hohe Lichtintensitäten angepaßt sind, als auch schattentolerante Blätter im Bestandesinneren entwickelt. Die Birke ist im Gegensatz zur Buche eine lichtbedürftige Pionierbaumart. Die Buntnessel zeichnet sich als eine krautige Pflanze aus den asiatischen und afrikanischen Tropen aus, die nicht an Temperaturschwankungen in ihrem natürlichen Habitat angepaßt ist. An den panaschierten Blättern der Buntnessel konnten gleichzeitig Untersuchungen in photosynthetisch aktiven und weißen, photosynthetisch inaktiven Blattbereichen vorgenommen werden. Damit konnte der Einfluß von Licht und Temperatur auf das antioxidative System unabhängig von der Photosynthese untersucht werden.

Die Birke wies bei hohen Lufttemperaturen höhere Elektronenflußraten als die Buche auf. Weitere Untersuchungen ergaben Hinweise darauf, daß diese höhere Toleranz gegenüber hohen Temperaturen darauf zurückzuführen ist, daß die Birke dem Temperaturstreß ausweicht: durch hohe Transpirationsraten wurde die Blattertemperatur gesenkt. Das Photosystem II der Buche zeigte sich gegenüber hohen Blattertemperaturen toleranter als das der Birke. Eine Kombination aus ungünstigen Temperaturen mit hohen Lichtintensitäten beantwortete die Buche mit einer frühen Herunterregulation des photosynthetischen Elektronenflusses, allerdings war ihr Photosyntheseapparat weniger anfällig für irreversible Störungen als das der Birke.

Lichtangepaßte Blätter der Buche wiesen höhere Aktivitäten der antioxidativen Enzyme Ascorbatperoxidase, Monodehydroascorbatradikalreduktase und Glutathionreduktase sowie höhere Konzentrationen an Ascorbat auf als Schattenblätter. Eine mehr als doppelt so hohe Nettphotosyntheserate der Lichtblätter gegenüber den Schattenblättern war gleichzeitig mit einer niedrigeren Effizienz der Elektronennutzung für die Assimilation von CO₂ verbunden. Dies kann, wenn andere Elektronensenken im Blatt fehlen (z. Bsp. Photosynthese, Schwefel- und Stickstoffassimilation) eine zweifach höhere oxidative Belastung der Lichtblätter im Vergleich zu Schattenblättern bedeuten. Diese Beobachtung war unabhängig von der Beleuchtungsstärke. Dies könnte die Ursache dafür sein, daß Lichtblätter gegenüber zusätzlichem, künstlich induziertem oxidativem Streß nicht resistenter waren als Schattenblätter, obgleich sie deutlich höhere antioxidative Enzymaktivitäten besaßen.

Im Gegensatz zur Buche zeigte die Buntnessel ein sehr enges Temperaturoptimum der relativen Elektronentransportraten von 20-25°C. Bei höheren oder niedrigeren Temperaturen wiesen die Pflanzen starke Streßsymptome auf. Die Buche reagierte auf unterschiedliche Temperaturen deutlich indifferenter als die Buntnessel.

Um zu überprüfen, ob die bessere Temperaturtoleranz der Buche mit einer erhöhten Fähigkeit zur Streßkompensation zusammenhing, wurde das antioxidative System untersucht. Die Aktivität der Ascorbatperoxidase in Buchen und Buntnesseln stieg mit sinkenden Temperaturen. Eine gleichzeitige Belichtung der Blätter verstärkte diesen Effekt. Im Gegensatz zur Ascorbatperoxidase reagierte die Glutathionreduktase eher auf hohe Temperaturen, wobei Licht diese Reaktion ebenfalls verstärkte. Die Reaktionen der Ascorbatperoxidase und der Glutathionreduktase auf Licht war jedoch unabhängig von der photosynthetischen Aktivität, da sie auch in belichteten weißen Blattabschnitten der

Buntnessel beobachtet wurden. Die Aktivität der MDAR sank bei niedrigen Temperaturen und zeigten keinen klaren Lichteffekt.

Bei hohen Temperaturen stiegen die Konzentrationen an Ascorbat und Glutathion in beiden Pflanzenarten, wobei die photosynthetische Aktivität notwendig schien, um die Ascorbatkonzentrationen aufrecht zu halten, jedoch nicht für den Erhalt der Glutathionkonzentrationen erforderlich war. Eine kurzfristige Anpassung von Buchen und Buntnesseln an niedrige Temperaturen zeigte sich anhand der Zunahme der Aktivitäten der Ascorbatperoxidase und der Superoxiddismutase. Die Glutathionreduktase war an der Anpassung an niedrige Temperaturen nicht beteiligt. Eine Anpassung an hohe Temperaturen zeigte sich zudem an einem Anstieg der Glutathionreduktaseaktivitäten und höheren Konzentrationen an Ascorbat und Glutathion.

Die geringere Temperaturtoleranz der Buntnessel im Vergleich zur Buche war offensichtlich darin begründet, daß einzelne Komponenten ihres antioxidativen Systems versagten, während dieses bei der Buche nicht der Fall war. Bei hohen Temperaturen bestand der auffälligste Unterschied zwischen den beiden Arten darin, daß in der Buntnessel die Aktivität der Ascorbatperoxidase erheblich höhere Verluste zeigte als in der Buche. Bei niedrigen Temperaturen zeigte sich ein anderes Muster: Beide Arten schienen nach einer Anpassung an 10°C noch ausreichend hohe Aktivitäten der Glutathionreduktase aufzuweisen, wenn die Enzymaktivitäten unter Standardbedingungen (25°C) gemessen wurden. Allerdings sanken die Aktivitäten der Glutathionreduktase stark, wenn sie bei Blatterperatur gemessen wurden. In *Coleus* war diese Abnahme größer als in der Buche. Streß durch niedrige Temperaturen führte in der Buntnessel zu einer relativ starken Abnahme an Glutathion und zu einem signifikanten Anstieg an Glutathiondisulfid. Da Glutathion ein wichtiges Antioxidans bei der Kälteanpassung ist, scheint das Glutathionsystem in der Buntnessel der schwache Punkt bei zu niedrigen Temperaturen zu sein.

Die Anpassungen des antioxidativen Systems an schwankende Temperaturen, die durch Licht noch verstärkt werden konnten, waren in der Buntnessel bei hohen und bei niedrigen Temperaturen nicht effizient, weil entweder die Ascorbatperoxidase oder die Glutathionreduktase und Glutathion im antioxidativen System ausfielen. Somit fiel das Entgiftungssystem für reaktiven Sauerstoff aus. Falls die Aktivität der Ascorbatperoxidase sich *in situ* im Blatt genauso verhält wie *in vitro* im Test, ist es wahrscheinlich, daß Buntnesselblätter bei hohen Temperaturen durch eine Akkumulation von H₂O₂ vergiftet werden. Das würde eine Inhibition des Calvinzyklus und damit der Photosynthese zur

Folge haben. Das könnte der Grund dafür, daß der photosynthetische Elektronentransport bei nicht optimalen Temperaturen in Buntnesselblättern herunterreguliert wurde.

In der Buntnessel wurde des weiteren gezeigt, daß die Temperatur und die photosynthetische Aktivität einen Einfluß auf die *de-novo*-Synthese von Ascorbat haben. Dazu wurde die Enzymaktivität der L-Galactosedehydrogenase, ein Schlüsselenzym der Ascorbatsynthese, in Extrakten aus grünen und weißen Blatteilen bei unterschiedlichen Temperaturen untersucht. Die L-Galactosedehydrogenase zeigte im allgemeinen steigende Aktivitäten mit steigender Temperatur. Dieses könnte ein Grund für die verstärkte Akkumulation von Ascorbat bei höheren Temperaturen sein.

Bei diurnalen Untersuchungen an Lichtblättern der Buche im Freiland wurden hohe Schwankungen des antioxidativen Systems, insbesondere der Ascorbatperoxidase und der Monodehydroascorbatradikalreduktase, beobachtet. Die Aktivitäten zeigten auch unter diesen Bedingungen eine Korrelation mit der Temperatur, aber nicht mit dem Licht. Die Glutathionreduktase zeigte eine verhältnismäßig geringe Fluktuation, aber keine signifikante Abhängigkeit von Licht oder Temperatur. Unter hohen Lichtintensitäten wurden signifikant erhöhte Konzentrationen an Ascorbat in den Blättern beobachtet, die aber innerhalb von vier Stunden etwa wieder abgebaut werden. Jedoch ist aus den Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen zu schließen, daß hohe Temperaturen und nicht Licht die maßgebliche Rolle spielte.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, daß Streßreaktionen der antioxidativen Schutzenzyme – anders als bislang in der Literatur häufig vermutet, vor allem durch die fluktuierende Temperatur ausgelöst werden. Die Richtung der Streßantwort der antioxidativen Enzyme hatte nicht immer eine hinreichende Streßkompensation zur Folge. Wenn aufgrund zu hoher oder zu niedriger Temperaturen die Funktion einer Komponente des antioxidativen Systems versagte, war die Schutzfunktion nicht mehr gegeben.

XI. Literatur

- Asada K (1994)** Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues: in: Foyer CH, Mullineaux P Hrsg., Photooxidative stresses in plants: Causes and Amelioration. CRC Press, Inc. Boca Raton 77-104
- Asada K (1999)** The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50: 601-639
- Badiani M, Paolacci AR, Fusari A, D'Ovidio R, Scandalios JG, Porceddu E, Giovannozzi Sermanni G (1997)** Non-optimal growth temperatures and antioxidants in the leaves of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. II. Short-term acclimation. Journal of Plant Physiology 151: 409-421
- Bieler K, Fock H (1996)** Evidence for the contribution of the Mehler-Peroxidase Reaction in dissipation excess electrons in drought-stressed wheat. Plant Physiol 112: 265-272
- Borracino G, Dipierro S, Arrigoni O (1989)** Interaction of ascorbate free radical reductase with sulphhydryl reagents. Phytochemistry 28: 715-717
- Chaves MM, Pereira J (1992)** Water stress, CO₂, and climate change. Journal of Experimental Botany 43: 1131-1139
- Cochard H, Lemoine D, Dreyer E (1999)** The effects of acclimation to sunlight on the xylem vulnerability to embolism in *Fagus sylvatica* L. Plant, Cell and Environment 22: 101-108
- Ellenberg H (1988)** Vegetation ecology of central Europe. Cambridge University Press, Cambridge, 731pp
- Elstner EF (1983)** Oxygen activation and oxygen toxicity. Annual Review of Plant Physiology 33: 73-96
- Eschrich W, Burchardt R, Essiamah S (1989)** The induction of sun and shade leaves of the European beech (*Fagus sylvatica*, L.): anatomical studies. Trees 3: 1-10
- Fadzilla NM, Gill V, Pinch RP, Burdon RH (1996)** Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. Planta 199: 552-556
- Foyer CH, Halliwell B (1976)** The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbate acid metabolism. Planta 133: 21-25
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994)** Photooxidative stress in plants. Physiologia Plantarum 92: 696-717

- Furbank RT, Badger MR (1983)** Oxygen exchange associated with electron transport and photophosphorylation in spinach thylakoids. *Biochimica Biophysica Acta* 723: 400-409
- García-Plazaola JI, Becerril JM (2000)** Photoprotection mechanisms in European beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings from diverse climatic origins. *Trees* 14: 339-343
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989)** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92
- Heber H, Bligny P, Streb P, Douce R (1996)** Photorespiration is essential for the protection of the photosynthetic apparatus of C₃ plants against photoinactivation under sunlight. *Botanica Acta* 109: 307-315
- Heber H, Gerst U, Krieger A, Neimanis S, Kobayashi Y (1995)** Coupled cyclic electron transport in intact chloroplasts and leaves of C₃ plants: Does it exist? If so, what is its function? *Photosynthetic Research* 46: 269-275
- Horemans N, Asard H, Caubergs RJ (1996)** Transport of ascorbate into plasma membrane vesicles of *Phaseolus vulgaris* L.. *Protoplasma* 194: 177-185
- Jahns P, Polle A, Junge W (1988)** The photosynthetic water oxidase: its proton pumping activity is short-circuited within the protein by DCCD. *The EMBO Journal* 7 (3): 589-594
- Jakob B, Heber U (1996)** Photoproduction and detoxification of hydroxyl radicals in chloroplasts and leaves and relation to photoinactivation of photosystems I and II. *Plant Cell Physiology* 37 (5): 629-635
- Kaiser W (1979)** Reversible inhibition of Calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta* 145: 377-385
- Krause GH, Weis E (1991)** Chlorophyll fluorescence and Photosynthesis: The basics. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349
- Lazár D, Ilík P (1997)** High-temperature induced chlorophyll fluorescence changes in barley leaves. Comparison of the critical temperatures determined from fluorescence induction and from fluorescence temperature curve. *Plant Science* 124: 159-164
- Lee DH, Lee CB (2000)** Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. *Plant Science* 159: 75-85
- Luwe M (1996)** Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves: seasonal variations and responses to changing ozone concentrations in air. *Plant, Cell and Environment* 19: 321-328

- Mahan JR, McMichael BL, Wanjura DF (1994)** Methods for reducing the adverse effect of temperature stress on plants: a review. *Environmental and Experimental Botany* 35 (3): 251-258
- Mehler AH (1951)** Studies on the reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Archive of Biochemical Biophysics* 33: 65-77
- Miyake C, Asada K (1984)** Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiology* 35: 539-549
- Nakano Y, Asada K (1987)** Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts its interaction in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radicals. *Plant Cell Physiology* 28: 131-140
- Osmond CB, Grace SC (1995)** Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* (46) 1351-1362
- Pallanca JE, Smirnoff N (1999)** Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of D-Glucosone, L-Sorbosone, and L-Galactono-1,4-Lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiology* 120: 453-461
- Peltzer D, Polle A (2001)** Diurnal fluctuations of antioxidative systems in leaves of field-grown beech trees (*Fagus sylvatica*): Responses to light and temperature. *Physiologia Plantarum* 111: 158-163
- Peltzer D, Dreyer E, Polle A (2001)** Differential temperature dependencies of antioxidative enzymes under photosynthetic and non-photosynthetic conditions in two species, *Fagus sylvatica* (L.) and *Coleus blumei* (Benth.). *New Phytologist*
- Peltzer D, Schwanz P, Polle A (1999a)** Charakterisierung der Anpassung von Buchenblättern (*Fagus sylvatica*, L.) an unterschiedliche Lichtbedingungen: Bielefelder Ökologische Beiträge, Ökophysiologie pflanzlicher Interaktionen 14 (II): 248-286
- Peltzer D, Schwanz P, Polle A (1999b)** Preliminary studies of ascorbate metabolism in green and albino regions of variegated leaves of *Coleus blumei*, Benth.. *Free Radical Research* 31: 181-185
- Polle A, Peltzer D, Schwanz P (2001)** Resistance against oxidative stress in leaves of young beech trees grown in model ecosystems with different soil qualities, elevated CO₂, and lachnid infestation. *Fostwissenschaftliches Centralblatt* 120:1-7

- Polle A, Matyssek R, Gunthardt-Goerg MS, Maurer S (2000)** Defense strategies against ozone in trees: The role of nutrition. *Environmental Pollution and Plant Responses*: 223-245
- Polle A (1996)** Mehler reaction: friend or foe in photosynthesis? *Botanica Acta* 109: 84-89
- Polle A, Morawe B (1995)** Seasonal changes of the antioxidative system in foliar buds and leaves of field-grown beech trees (*Fagus sylvatica*, L.) in a stressful climate. *Botanica Acta* 108: 314-320
- Polle A, Rennenberg H (1993) **Significance of antioxidants in plant adaptation to environmental stress.** In: Fowden L, Mansfield FT, Stoddard J, Hrsg. **Plant adaptation to environmental stress.** Chapman & Hall, London: 263-273
- Polle A, Chakrabarti K, Schürmann W, Rennenberg H (1990)** Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce (*Picea abies*, L., Karst.) *Plant Physiology* 94: 312-319
- Scandalios JG (1993)** Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101: 7-12
- Schwanz P, Polle A (1998)** Antioxidative systems, pigment and protein contents in leaves of adult mediterranean oak species (*Quercus pubescens* and *Q. ilex*) with lifetime exposure to elevated CO₂. *New-Phytologist* 140 (3): 411-423
- Schwanz P, Picon C, Vivin P, Dreyer E, Guehl JM, Polle A (1996)** Responses of antioxidative systems to drought stress in pedunculate oak and maritime pine as modulated by elevated CO₂. *Plant Physiology* 110 (2): 393-402
- Tognetti R, Johnson JD, Michelozzi M (1997)** Ecophysiological responses of *Fagus sylvatica* seedlings to changing light conditions. I. Interactions between photosynthetic acclimation and photoinhibition during simulated canopy gap formation. *Physiologia Plantarum* 101: 115-123
- Tognetti R, Minotta G, Pinzauti S, Michelozzi M, Borghetti M (1998)** Acclimation to changing light conditions of long-term shade-grown beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings of different geographic origins. *Trees* 12: 326-333
- Willert DJ, Matyssek R, Hespich W (1995)** Experimentelle Pflanzenphysiologie, Grundlagen und Anwendungen. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart: pp 207-233
- Winston GW (1990)** Physiological basis for free radical formation in cells: production and defence. In: Alscher RG and Cummings RJ, Hrsg., *Stress responses in plants: Adaptation and acclimation mechanisms.* Wiley Lissabon, Inc. New York 57-86

Wu J, Nelmanis S, Heber U (1991) Photorespiration is more effective than the Mehler reaction in protecting the photosynthetic apparatus against photoinhibition. *Botanica Acta* 104: 283-291

Ye L, Gao H, Zou Q (2000) Responses of the antioxidant systems and xanthophyll cycle in *Phaseolus vulgaris* to the combined stress of high irradiance and high temperature. *Photosynthetica* 38 (2): 205-210

Yordanov I, Velikova V, Tsonev T (2000) Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica* 38 (1): 171-186

Lebenslauf

persönliche Daten

Name, Vorname	Peltzer, Detlef
geboren	13.12.1968 in Helmarshausen
Adresse	Grimmerfelder Str. 10 c/o Schoensee 37170 Delliehausen (Uslar)

schulische Ausbildung und beruflicher Werdegang

Schulabschluß	Abitur im Mai 1990 in Uslar (Niedersachsen), Schnitt 1,6
Zivildienst	Juni 1990 bis September 1991 im Naturpark Solling-Vogler
Ausbildung	Studium der Forstwissenschaften in Göttingen von Oktober 1991 bis November 1996 mit dem Schwerpunkt Biologie-Ökologie, Schnitt 2,7
studienbegleitende Tätigkeiten	geobotanisches Biomonitoring in verschiedenen Projekten der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt in Göttingen;
momentane Tätigkeit	seit dem 1. April 1997 Doktorand am Institut für Forstbotanik und Baumphysiologie mit dem Thema der Dissertation „Anpassung antioxidativer Systeme an Temperatur und Licht: holzige und krautige Pflanzen im Vergleich“.

Auslandspraktika

Mai bis Juli 1999: Untersuchungen zur Anpassung der Photosynthese an Licht und Temperatur in Buche (*Fagus sylvatica*, L.) und Birke (*Betula verrucosa*, L.) bei der INRA Nancy, Equipe Bioclimatologie-Ecophysiologie, Unité d'Ecophysiologie Forestière, Champenoux, F-54280 Seichamps, Frankreich.

Posterbeiträge

8. bis 9. Mai 1998: Präsentation eines Posterbeitrages auf der 3. Jahrestagung des Arbeitskreises „Experimentelle Ökologie der Pflanzen“ in Bielefeld. Titel: „The role of antioxidants in light acclimation of beech (*Fagus sylvatica*)“.

2. bis 6. April 2001: Präsentation eines Posterbeitrages auf einem Kongreß der SEB (Society of Experimental Botany) in Canterbury (Großbritannien). Titel: „Does ascorbate play a role in protection from high light? Differential effects of ascorbate feeding in sun- and shade-acclimated leaves of beech (*Fagus sylvatica*)“.

Diese Arbeit wäre ohne Hanna und Herbert Schoensee nicht möglich gewesen, die sich mit größtem Einsatz um meine Ausbildung bemüht haben.

Ganz herzlichen Dank!