

**FLUOROMETRISCHE UNTERSUCHUNG DER C3- UND CAM-FORM VON ME-
SEMBRYANTUM CRYSTALLINUM UND CAM-INDUKTION DURCH SALZ- UND
HITZESTRESS**

Jens Buttgerit
Robert Kase
Herma Hildebrandt

Institut für Pflanzenphysiologie der Freien Universität Berlin (Jan./Feb. 2001)
Praktikum „Ökophysiologie“ bei Prof. J.Schmitt

Abstract:

Im Verlauf ihrer Wachstumsphase wechselt *Mesembryanthemum crystallinum* von der C3- zur CAM-Form. Die physiologischen Veränderungen, die neben Veränderungen in der Morphologie auftreten, haben einen Einfluß auf die Chlorophyllfluoreszenz. Diese Form der Energiedissipation kann mittels (PAM-) Fluorometrie quantifiziert werden.

Um Aussage zu treffen, ob nun die C3- oder die CAM-Form vorliegt, können verschiedene Parameter aus der fluorometrischen Messung herangezogen werden (qS , $1-qP$, Fv/Fm). Die Werte für das „Nichtphotochemische-Fluoreszenzquenching“ (qN) zeigen den größten Unterschied zwischen der C3- und der CAM-Form und sind damit gut geeignet, um sicher und einfach herauszufinden, welche der beiden Formen vorliegt und wie die Verhältnisse der verschiedenen Stoffwechselwege zueinander gelagert sind.

Unter dem Einfluß von Hitze und/oder einer Salzlösung als Bewässerungsmedium, trat die CAM-Form schon in jüngeren Altersstufen auf. Durch geeignete Stressfaktoren kann also CAM auch induziert werden, was der Pflanze, in ihrer natürlichen Umgebung, bei sich ändernden Umweltbedingungen/ -faktoren (z.B. längere Trockenzeit, die auch eine höhere Salzkonzentration im restlichen Bodenwasser bewirkt) Vorteile bringt, die letztendlich ihre Überlebenswahrscheinlichkeit deutlich erhöht.

Einführung:

Photosynthese ist die lichtgetriebene Fixierung von Kohlendioxid, welches dann in Kohlenhydrate und andere wichtige biologische Moleküle umgewandelt wird. Sie wird durch zwei Photosysteme vermittelt, die sich in der Thylakoidmembran der Chloroplasten befinden. Der durch die Lichtenergie angeregte Elektronenfluß erzeugt einen transmembranen Protonengradienten, welcher die ATP-Synthase antreibt. Ferner wird $NADPH+H^+$ als Reduktionsäquivalent für die Dunkelreaktion bereitgestellt.

Das beim Transfer der Elektronen vom Ferredoxin reduzierte Thioredoxin aktiviert Enzyme des Calvinzyklus, indem es Disulfidbrücken reduziert und damit den Übergang von der T- zur R-Form herbeiführt. Auch die lichtinduzierte Erhöhung des pH-Wertes und der Mg^{2+} -Kon-

zentration des Stromas fördern die Carboxylierung des Ribulose-1.5-Bisphosphats. Die Gesamtstöchiometrie des Calvinzyklus lautet:
 $3 CO_2 + 9 ATP + 6 NADPH \rightarrow GAP + 9 ADP + 8 Pi + 6 NADP^+$

Die sehr ineffizient wirkende Ribulose-1.5-Bisphosphat-Carboxylase katalysiert auch eine konkurrierende Oxygenasereaktion, bei der Phosphoglycolat und 3-Phosphoglycerat entstehen. Die Rückführung des Phosphoglycolats in den Stoffwechsel führt zur Freisetzung von CO_2 und zum weiteren Verbrauch von Sauerstoff.

Dieser Prozeß wird als Photorespiration bezeichnet, ein ATP- und $NADPH+H^+$ -verschwendender Stoffwechselweg, der das Wachstum der Pflanzen begrenzt, insbesondere bei warmen und/oder CO_2 -armen Bedingungen. Bestimmte Pflanzen (Zuckerrohr, Mais u.a.) haben einen Stoffwechselzyklus, den C4-Zyklus, der es erlaubt CO_2 in den photosynthetischen Zellen zu konzentrieren. Durch hohe CO_2 -Konzentrationen wird die Photorespiration nahezu vollständig unterdrückt.

Somit haben C4-Pflanzen in heißeren Klimaten bzw. bei CO_2 -ärmerer Luft einen wesentlichen Wachstumsvorteil gegenüber den C3-Pflanzen, bei gleichen Bedingungen. Allerdings hat der C4-Weg auch einen höheren energetischen Preis.

CAM-Pflanzen (Crassulacean Acid Metabolism) speichern CO_2 in einer Variante des C4-Zyklus. Hier werden die CO_2 -Aufnahme und der Calvin-Zyklus zeitlich, aber nicht räumlich getrennt.

CAM kommt bei vielen wüstenbewohnenden, sukkulenten Pflanzen vor. Wenn sie, wie die meisten Pflanzen, ihre Stomata bei Tag öffnen würden, um CO_2 aufzunehmen, würden sie gleichzeitig große Mengen an Wasser durch Verdampfen verlieren. Um diesen Verlust zu minimieren, absorbieren diese Pflanzen das benötigte CO_2 nur bei Nacht, wenn es relativ kühl ist.

Das CO_2 wird, mittels Carboanhydrase, in Hydrogencarbonat überführt. Die PEP-Carboxylase überführt das Phosphoenolpyruvat in Oxalacetat, welches dann zu Malat reduziert wird.

Bei geschlossenen Stomata (tagsüber) kann das CO_2 , mit dem Malat-Enzym, wieder aus dem Malat abgespalten werden und steht dann zum dem Akzeptor Ribulose-1.5-Bisphosphat zur Verfügung. Somit ist es CAM-Pflanzen also möglich, Photosynthese mit stark minimierten Wasserverlust zu betreiben.

Im Verlauf ihrer Wachstumsphase wechselt *Mesembryanthemum crystallinum* von der C3- zur CAM-Form. Die physiologischen Veränderungen, die neben Veränderungen in der Morphologie auftreten, haben einen Einfluß auf die Chlorophyllfluoreszenz. Diese Form der Energiedissipation kann mittels (PAM-) Fluorometrie quantifiziert werden.

Der Polyeigenschaften der photosynthetisch aktiven Pigmente erlaubt es ihnen, das Licht des sichtbaren Bereiches zu absorbieren. Die aufgenommene Lichtenergie kann auf unterschiedliche Art und Weise abgegeben werden. Die Energiedissipation kann durch Wärme, photochemische Arbeit, Fluoreszenz und/oder Phosphoreszenz erfolgen. Der Anteil der Fluoreszenz beträgt normalerweise 1-3%, kann aber ansteigen, wenn unter Streßeinfluß der Ablauf der Photosynthese gestört wird, ohne daß gleichzeitig vermehrt Wärme abgegeben werden kann (Fluoreszenz + Photochemie + Wärme = 1 ; Prozesse konkurrieren miteinander). Die Fluoreszenzsignale sind also einerseits eine Funktion der Zeit und andererseits auch von der Ausprägung der anderen Dissipationsvorgänge abhängig.

Wird ein Pflanzenblatt, welches vorher einige Zeit im Dunkeln aufbewahrt wurde, mit aktinischen Licht bestrahlt, kann man einen charakteristischen Verlauf des Fluoreszenzsignales beobachten (Kautsky-Kurve/-effekt).

Nach Anschalten des Meßlichtes, am Fluorometer, beobachtet man die Grundfluoreszenz F_0 , die aus der Fluoreszenzemission der angeregten Chlorophyll-a-Moleküle resultiert. Dieses Signal ist unabhängig von den photochemischen Prozessen. Nach Anschalten des aktinischen Lichts beobachtet man einen komplexen Anstieg der Fluoreszenz von F_0 zu F_p (p für „Peak“). Bei sättigendem Licht erreicht F_p einen Maximalwert (F_{max}). Dieser Anstieg steht mit der Poolgröße des reduzierten Plastoquinons in Zusammenhang. Da der Calvin-Zyklus, nach einer längeren Verdunklung, erst mit einiger Verzögerung „anspringt“, kommt es zu einem Elektronenrückstau. Die überschüssige Energie wird dann (u.a.) als Fluoreszenz abgegeben, die vom Meßgerät registriert werden kann.

Der „schnellen Kinetik“ (Anstieg bis F_p bzw. F_{max} ; Dauer: wenige Sekunden) folgt die „langsame Kinetik“. Hierbei nimmt das Fluoreszenzsignal infolge photochemischer (qP) und nichtphotochemischer (qN- hierbei spielt die Ausprägung des Protonengradienten über die Thylakoidmembran die entscheidende

Rolle) Arbeit ab (Löschung=Quenching) bis zu einem terminalen Fluoreszenzwert F_t und bleibt dann konstant.

Die Dauer der „langsamen Kinetik“ umfaßt einige Minuten.

Zur Messung der Fluoreszenz bzw. des Fluoreszenzverlaufs eignen sich das PSM (Plant-Stress-Meter) und die Modulierten Fluorometer (dazu gehört auch das PAM = Puls-Amplituden-Modulation). Mit beiden Systemen kann man nichtdestruktiv die langsame und schnelle Fluoreszenzkinetik verfolgen. Es kann an Ort und Stelle Aussage über die aktuelle Nutzung der Lichtenergie, Höhe des Protonengradienten und die Einflüsse von Streßfaktoren getroffen werden.

Im durchgeführten Experiment haben wir versucht mit dem Fluorometer nachzuweisen, welche Stoffwechselform (C3 oder CAM) in der jeweiligen Altersklasse der *Mesembryanthemum crystallinum* vorliegt und wann der Wechsel erfolgt.

Dazu können verschiedene Fluorometerdaten herangezogen werden (qS, 1-qP, qN).

Weiterhin haben wir untersucht, ob der Einfluß von Hitze und/ oder Salzlösung als Bewässerungsmedium eine Induktion von CAM bewirkt.

Durchführung

Pflanzen:

Die *Mesembryanthemum-crystallinum*-Pflanzen wurden in der Gärtnerei der „Pflanzenphysiologie“ gehalten. Uns standen mehrere Individuen von den jeweiligen Altersklassen zur Verfügung.

Die Pflanzen wurden insgesamt 12 Stunden am Tag mittels Quecksilberdampflampen belichtet (vom 7.00 Uhr bis 19.00 Uhr) zusätzlich stankamen sie auch Tageslicht durch das Gewächshausdach (von etwa 7.30 Uhr bis 17.00 Uhr). Die Temperatur im Gewächshaus betrug tagsüber etwa 25 Grad und in der Nacht etwa 18 Grad.

Als Wachstumsmedium diente eine mineralstoffreduzierte Erde.

Gewässert wurden die Pflanzen durchschnittlich um 10.00 Uhr, von den Gärtnern, die Pflanzen, die mit Salzwasser behandelt wurden, wurden von uns gewässert (s.u.).

CAM-Induktion:

Die Induktion von CAM sollte mittels Salzbehandlung, Thermobehandlung und Salz- und Thermobehandlung zusammen erfolgen.

Wir hatten also 3 Altersreihen der Pflanzen, die mit der jeweiligen Induktionsbehandlung unterzogen wurden. Eine 4. Reihe wurde weiterhin unter normalen Bedingungen und in räumlicher Nähe zu den behandelten Pflanzen gehalten und diente bei den Messungen als Referenzstandard.

Die Salzbehandlung gestaltete sich derart, daß die betreffenden Altersreihen („nur Salz“ und (H)itze-(S)alz-(S)tress) mit 50ml einer 500mM Kochsalzlösung (zum Ansetzen der Lösung wurde handelsübliches iodiertes Kochsaz verwendet) täglich zwischen 8.00 Uhr und 9.00 Uhr gegossen wurden.

Die Hitzebehandlung erfolgte in einem Wärmeschrank, bei 50 Grad, für etwa eine Stunde. Diese Werte basierten auf Voruntersuchungen (R. Kase et al. 2001).

Verifizierung der Fluoreszenzerggebnisse durch Titration mit NaOH

Um das Ergebnis der physikalischen Messung zu sichern, wurden einen Tag später Blattproben entnommen um dann den Säuregehalt chemisch zu untersuchen. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Blätter verwendet wurden, die auch fluorometrisch untersucht worden sind bzw. diesen äquivalent waren (Größe, Blattebene, Lichtexposition, Vitalität...).

Pflanzen, die keine Blätter mehr hatten (90 Tage und älter) konnten nicht fluorometrisch untersucht werden, es wurden aber Stielproben entnommen und ebenfalls auf den Säuregehalt untersucht.

Je 1 Gramm des Frischmaterials der jeweiligen Pflanze wurde in Erlenmeyerkolben überführt. Es erfolgte die Zugabe von 50ml einer 30%igen Ethanollösung, danach wurden die Ansätze im Wasserbad für 30 Minuten gekocht. Nach Abkühlen der Proben wurde Phenolphthaleinlösung (20µl) hinzugegeben und mit 0,01 M NaOH, bis zur leichten Rosafärbung titriert.

Fluoreszenzanalyse

Alle Messungen wurde an einen Pulsmodulierten Fluorometer der Firma „Walz“ (Typ: PAM 2000) durchgeführt. Die entsprechende Software stammt ebenfalls von dieser Firma. Die Geräteeinstellung, die am geeignetstem war, wurde in Vorversuchen ermittelt. Gemessen wurde im „Saturation-Pulse-Mode“. Folgende Einstellungen wurden verwendet:
 - Actinisches Licht: Intensität „10“ (entspricht einem PAR (photosynthetically active radiation) von etwa 310 µmol Quanten/m² * s

exp 2 . Die Sättigungspulse hatten die Intensität „9“. Sättigungspulse erfolgten in 20 Sekunden-Abständen und hatten eine Dauer von jeweils 0,8 Sekunden. „Gain“ hatte den Wert „3“, „Damp“ betrug „5“.

Die Temperatur betrug durchschnittlich 22 Grad (genaue Werte sind dem Anhang zu entnehmen).

Das genaue Procedere einer Messung lief folgendermaßen ab (Graphik s. Bild 1):

1. Die zu untersuchende Pflanze wurde erst kurz vor der Messung aus der Gärtnerei geholt und für 5 Minuten in einen dunklen Raum zur Dunkeladaptation, gestellt.
2. Die Pflanze wurde mit einem Blatt am Meßkopf befestigt und mit einem Tuch abgedeckt.
3. Der Start erfolgte mit Einschalten des Meßlichts (Start der Stoppuhr).
4. Nach 15 Sekunden wurde ein M-Blitz (Sättigungspuls, der den ganzen Pool an Plastochinon plötzlich reduziert).
5. Bei 30 Sekunden wurde das aktinische Licht eingeschaltet (A-Taste).
6. Bei 45 Sekunden wurde der Puls-Modus gestartet, die Pulsgabe erfolgte dann automatisch alle 20 Sekunden.
7. Nach 15 Minuten wurden Pulsmodus, Aktinisches Licht und Meßlicht ausgeschaltet.
8. Nach 3 Minuten Dunkelheit wurde manuell ein S-Blitz gegeben, um qS (Relaxation) zu ermitteln.

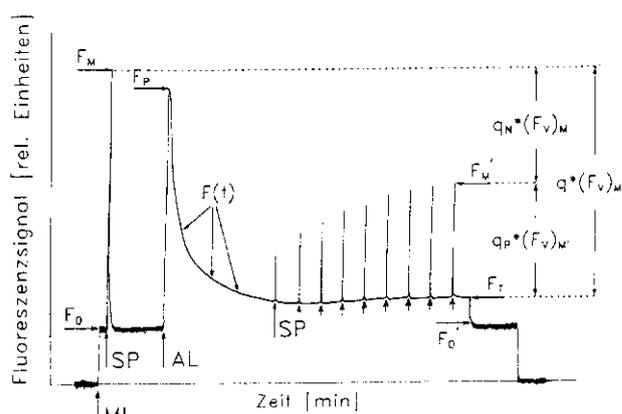


Bild 1: Schematischer Fluoreszenzverlauf zur Verdeutlichung des o.g. Meßprocederes. (ML-Meßlicht; SP-Sättigungspuls; Fo-Grundfluoreszenz; AL-aktin. Licht; Ft-terminale Fluoreszenz;)

Als erstes wurde überprüft, welche Parameter die größten Unterschiede zwischen C3- und CAM-Modus zeigen. Dazu wurde die komplette Altersreihe der unbehandelten Pflanzen der fluorometrischen Untersuchung unterzogen. Die Messungen begannen eine Stunde nach Belichtungsbeginn, um sicher sein zu können, daß die Malatkonzentration noch relativ hoch war. Unter dem Aspekt, daß die Malatspeicher mit zunehmender Belichtungsdauer immer kleiner werden, wurden die Messungen möglichst zügig durchgeführt. Die Pflanzen wurden generell erst kurz vor der Messung aus dem Gewächshaus entnommen.

Die Graphische Darstellung der Ergebnisse ist im Bild 2 zu sehen.

Das Fv/Fm ist bei allen untersuchten Altersstufen relativ gleich, mit diesen Werten läßt sich also keine Aussage über das Vorliegen von C3 oder Cam treffen. Allerdings kann man bei einem Fv/Fm bei 0,8 davon ausgehen, daß keine Photoinhibition vorliegt.

Die Meßwerte zu qP zeigen, daß der Reduktionsstatus des Plastochinons mit steigendem Alter der Pflanzen (bei gleicher Belichtungszeit !) wächst. Ein starker Anstieg des 1-qP-Wertes ist zwischen einem Alter zwischen 56 und 63 Tagen zu erkennen. Nach einer stationären Phase erfolgt vom 77. bis zum 98. Lebensstag ein weiterer steiler Anstieg.

Weniger signifikant ist der Relaxationswert qS. Hier ist zwar ein gewisser Aufwärtstrend zu erkennen, Unterschiede in diesem Wert sind aber nur zwischen der ältesten und zweitältesten Pflanze deutlich.

Am deutlichsten verändert sich qN mit dem Alter der Pflanzen. Dieser nichtphotochemische Lösungskoeffizient, die primär durch den Protonengradienten bedingt ist, erlebt vom Tag 56-63 den größten Anstieg, durchläuft eine stationäre Phase zwischen Tag 63-77 und steigt dann nochmals (um 0,1) zwischen Tag 77-84 und bleibt dann konstant.

Verglichen mit dem Bild 6 (Titration) kann man sagen, daß der Wechsel zu CAM (bei den Referenzpflanzen (unbehandelt) etwa ab dem 63. Tag erfolgt. Zwischen Tag 70-84 bleibt der Säuregehalt konstant und steigt zwischen Tag 84 und 91 noch einmal stark an, fällt danach aber wieder um etwa 40% ab.

Der qN-Wert scheint recht brauchbar zu sein, um fluorometrisch den CAM-Stoffwechsel nachzuweisen, allerdings stieg qN schon etwas früher an, verglichen mit dem Säurespiegel, der primär durch Malatakkumulation bestimmt wird. Der 1-qP-Wert scheint, auf den ersten

Blick ebenfalls ein gutes Signal geben, dies hat sich allerdings in den weiteren Messungen nicht bestätigt.

Sehr anschaulich ist der Zusammenhang zwischen qN und der Säuremenge im Bild 7 illustriert. Es ist zu erkennen, daß qN bis zu einer Konzentration von 32µmol (je Gramm Biomasse) relativ konstant bei etwa 0,425 liegt. Blätter mit einer Protonenkonzentration über 32µmol/g zeigen wesentlich höhere qN's, die, im Vergleich zum Grundwert fast die doppelte Höhe erreichen können.

Wenn man den Verlauf der Kurve betrachtet, fällt (wenn der Wert bei 112µmol/g als Ausreißer gewertet wird) eine deutliche Sigmoidität auf. Um dies natürlich endgültig zu belegen müßten noch mehr Alterstufen untersucht werden.

Im Bild 3 sind die Meßergebnisse für die salzbehandelten Pflanzen, im Vergleich zu den Referenzpflanzendaten dargestellt. Die Unterschiede bei den qS- und 1-qP-Werten zwischen behandelten und unbehandelten Pflanzen sind klein. Die qN-Werte der salzbehandelten Pflanzen sind generell um etwa 0,1 höher, als die der Referenzpflanzen. Der Wechsel zu CAM erfolgt schon zwischen dem 40. und 52. Tag. Bestätigt wird dies durch die Titrationsergebnisse (Bild 6). Die Morphologische Entwicklung der salzgestreßten Pflanzen scheint ebenfalls der, der Referenz vorauszuweichen.

So zeigen beispielsweise die Pflanzen vom 05. Dezember 2000 (siehe Bild 8) eine ausgeprägte Stielbildung und eine Reduktion/Verkleinerung der Blätter. Diese Merkmale finden sich bei den unbehandelten Pflanzen erst in der nächst höheren (vom 28.11.2000) Altersstufe. Weniger gut induzierend wirkte der Hitzestress. Das Bild 4 zeigt zwischen Tag 63 und 70 nur wenig höhere (0,05-0,1) qN-Werte bei den behandelten Pflanzen. Unterschiede in den qS- und 1-qP-Werten sind auch nicht sonderlich spezifisch. Die Titrationsergebnisse zeigen, daß der Säuregehalt ab Tag 53 etwas höher liegt, als der, der Referenz. In höheren Altersstufen scheint CAM stärker ausgeprägt zu sein, als in den unbehandelten Pflanzen.

Morphologische Unterschiede (Hitze/Referenz) sind nicht zu erkennen.

Die qN-Werte der hitze- und salzbehandelten Pflanzen sind bis zum 64. Tag nicht wesentlich höher, als die der Referenzpflanzen. Danach erfolgt allerdings ein starker Anstieg. Insgesamt sind im höheren Alter die qN's um etwa 0,2 höher. Die Titrationsergebnisse zeigen erhöhte Säurewerte ab dem Tag 40, die

im Bereich der Werte liegen, die auch für die salzbehandelten Pflanzen ermittelt wurden. Nach etwa dem 70. Tag erfolgt eine starke Zunahme des Säuregehaltes, der aber dann wieder sinkt und dann am Tag 105 im Bereich der salzbehandelten Pflanzen liegt.

Optisch scheinen die salz- und hitzebehandelten Pflanzen etwas weiter entwickelt zu sein, alt gleichaltrige, unbehandelte Individuen. Dies gilt aber nicht für beiden jüngsten Altersstufen. Insgesamt scheint die CAM-Induktion durch Salzstreß die wirkungsvollste Methode zu sein, während der Hitzestreß nur eine geringe Induktionswirkung hatte. Vermutlich war die Behandlungsdauer von einer Stunde zu gering und/oder die Temperatur zu niedrig. Zur Findung idealer Parameter müßten wesentlich umfangreichere Versuche durchgeführt werden müssen. Etwas verwunderlich war, daß die Induktionswirkung von Hitze- und Salzstress geringer war, als bei Salzstress allein. Der Säuregehalt der Pflanzen im Alter zwischen 77 und 84 Tagen war allerdings der höchste überhaupt.

Die geringere Induktion kann man sich nur mit einer gewissen Varianz erklären. Für eindeutige Aussagen müßten auch generell mehr Individuen zu genau der gleichen Tageszeit untersucht werden.

Im Endergebnis wurde gezeigt, daß der CAM-Stoffwechsel Veränderungen im Fluoreszenzverhalten der Pflanzen führt und q_N der Parameter ist, der die deutlichste Änderung zeigt. Spätere Versuche haben gezeigt, daß sich q_S zwischen CAM und C3 ebenfalls sehr stark unterscheidet, wenn die Verdunklungszeit nach der 15minütigen Messung kleiner gewählt wird (etwas 1 Minute).

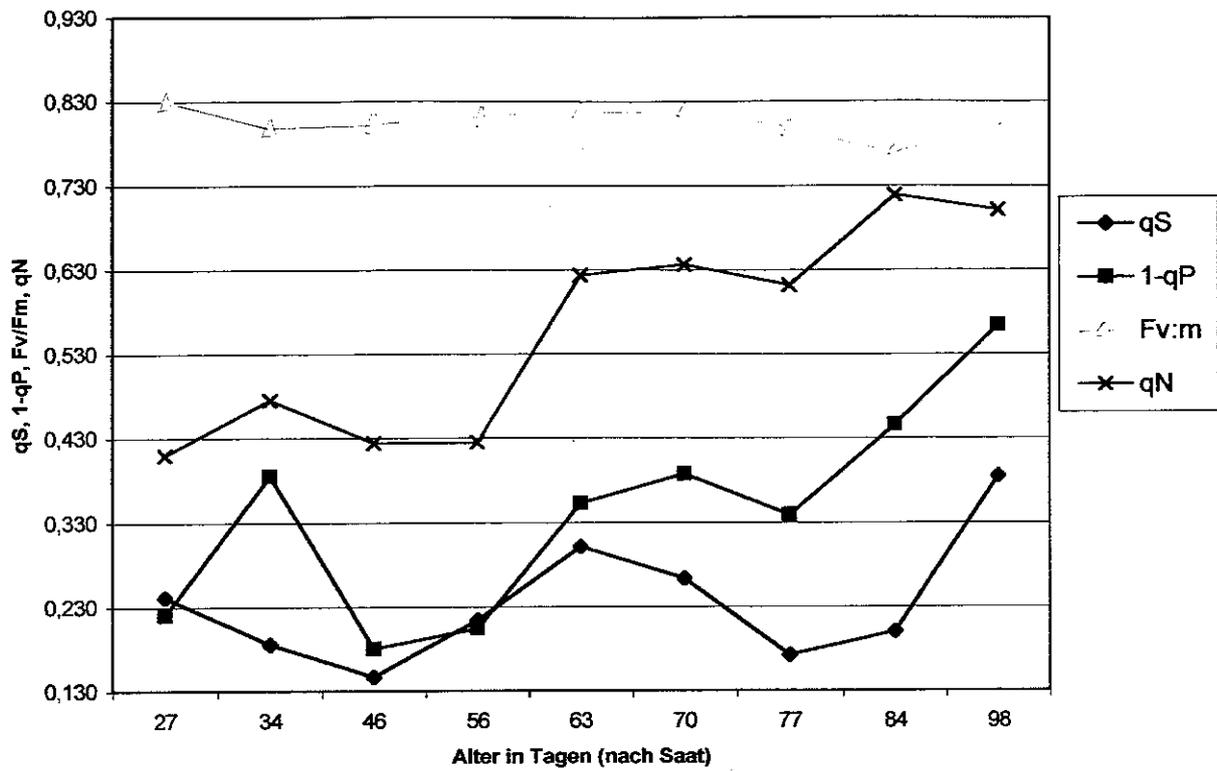


Bild 2: Auftragung von qS, 1-qP, Fv/Fm und qN gegen das Alter (nach Saat) der Pflanzen

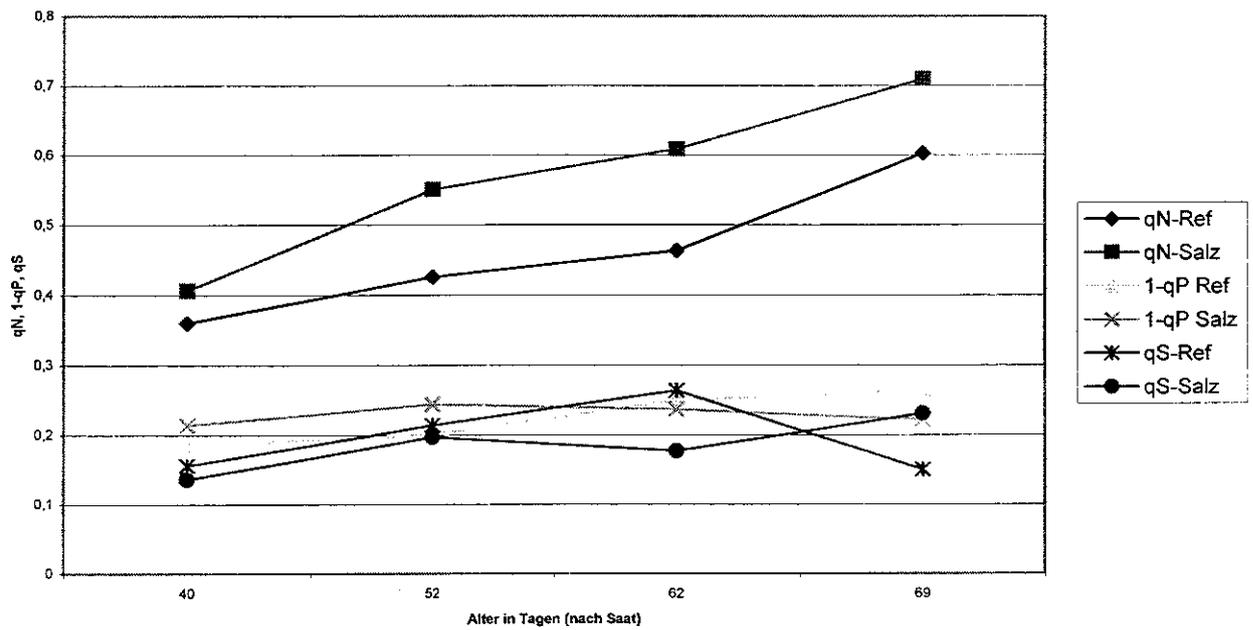


Bild 3: Auftragung von qN, 1-qP und qS gegen das Alter (nach Saat) salzbehandelter Pflanzen

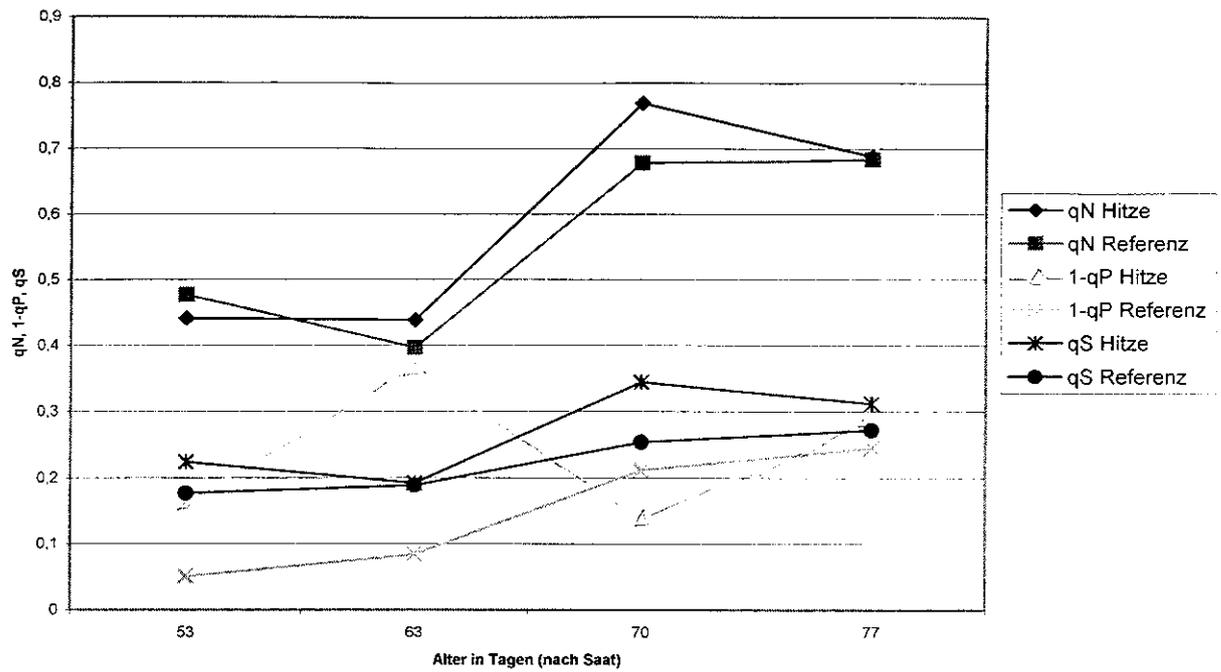


Bild 4: Auftragung qN, 1-qP und qS gegen das Alter (nach Saat) hitzebehandelter Pflanzen

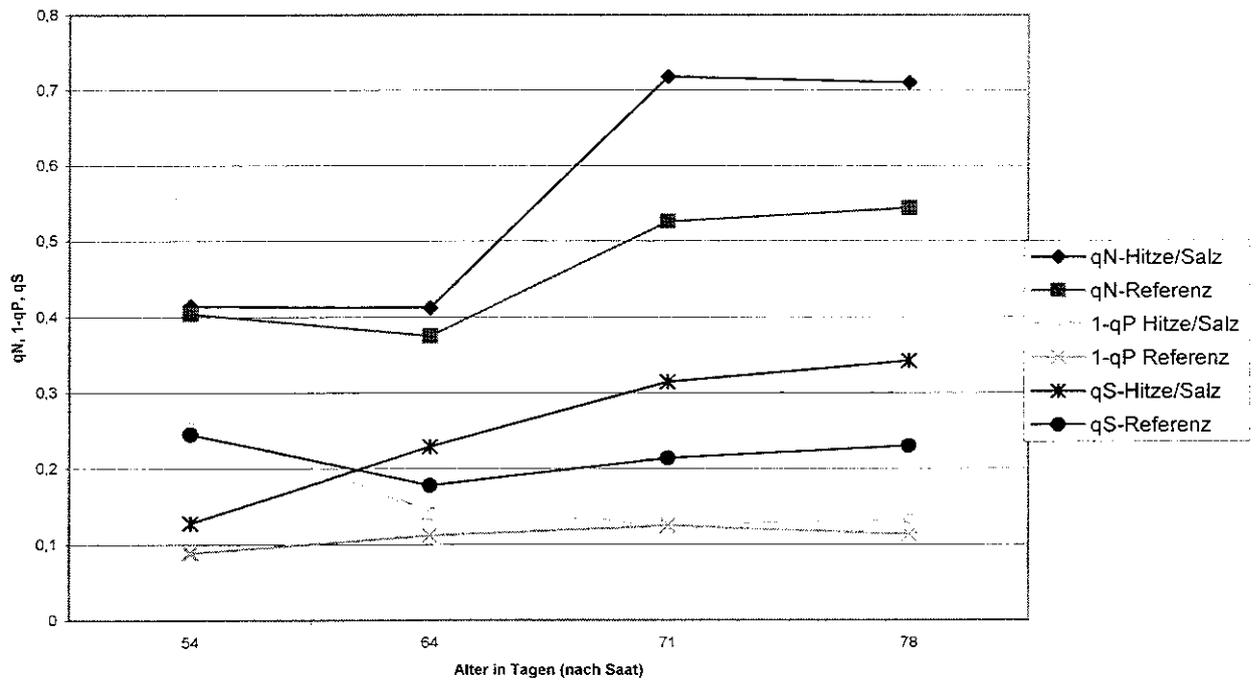


Bild 5: Auftragung qN, 1-qP und qS gegen das Alter (nach Saat) hitze- und salzbehandelter Pflanzen

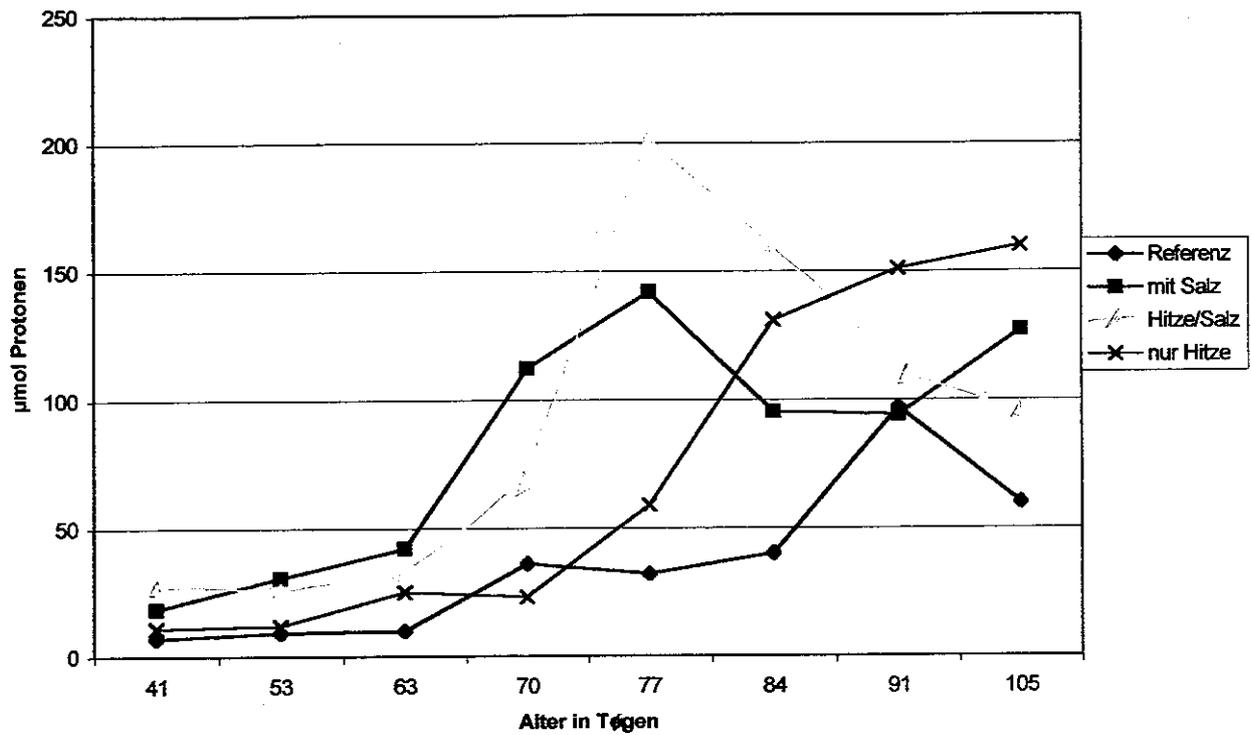
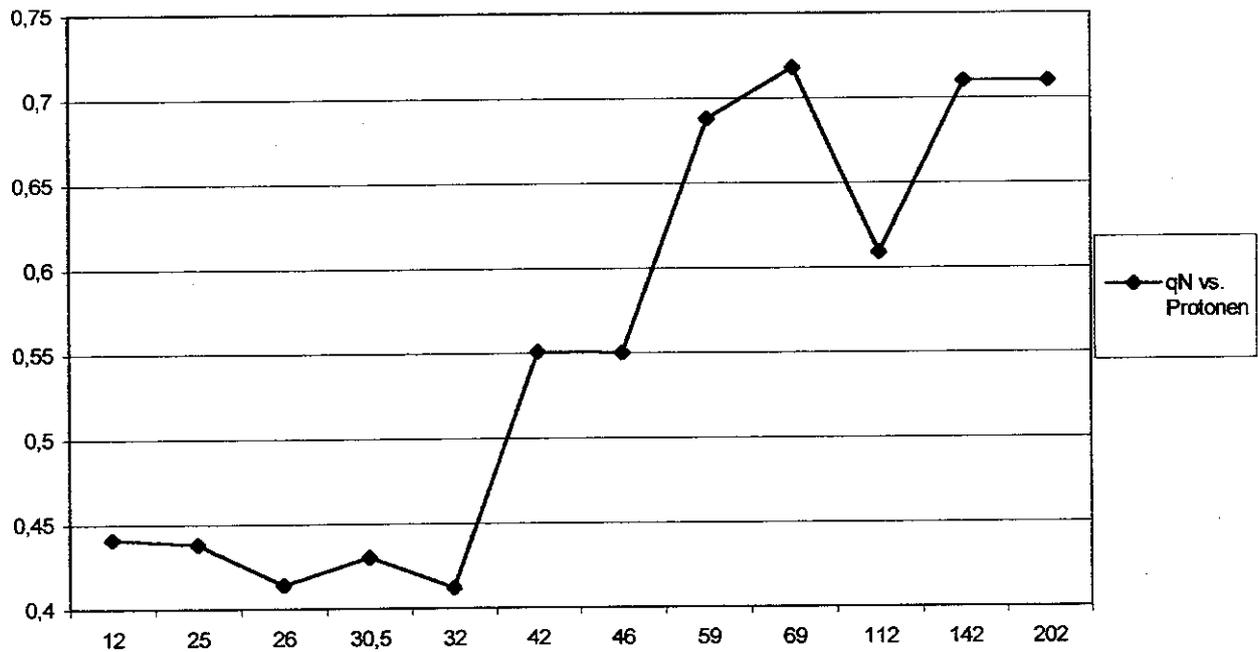


Bild 6: Titrationsergebnisse- µmol Protonen vs. Alter der Pflanzen (nach Saat; alle 4 Sorten)

Arbeit?



Einheit?

Bild 7: Auftragung von qN vs. µmol Protonen (behandelte Pflanzen)

1/g FW

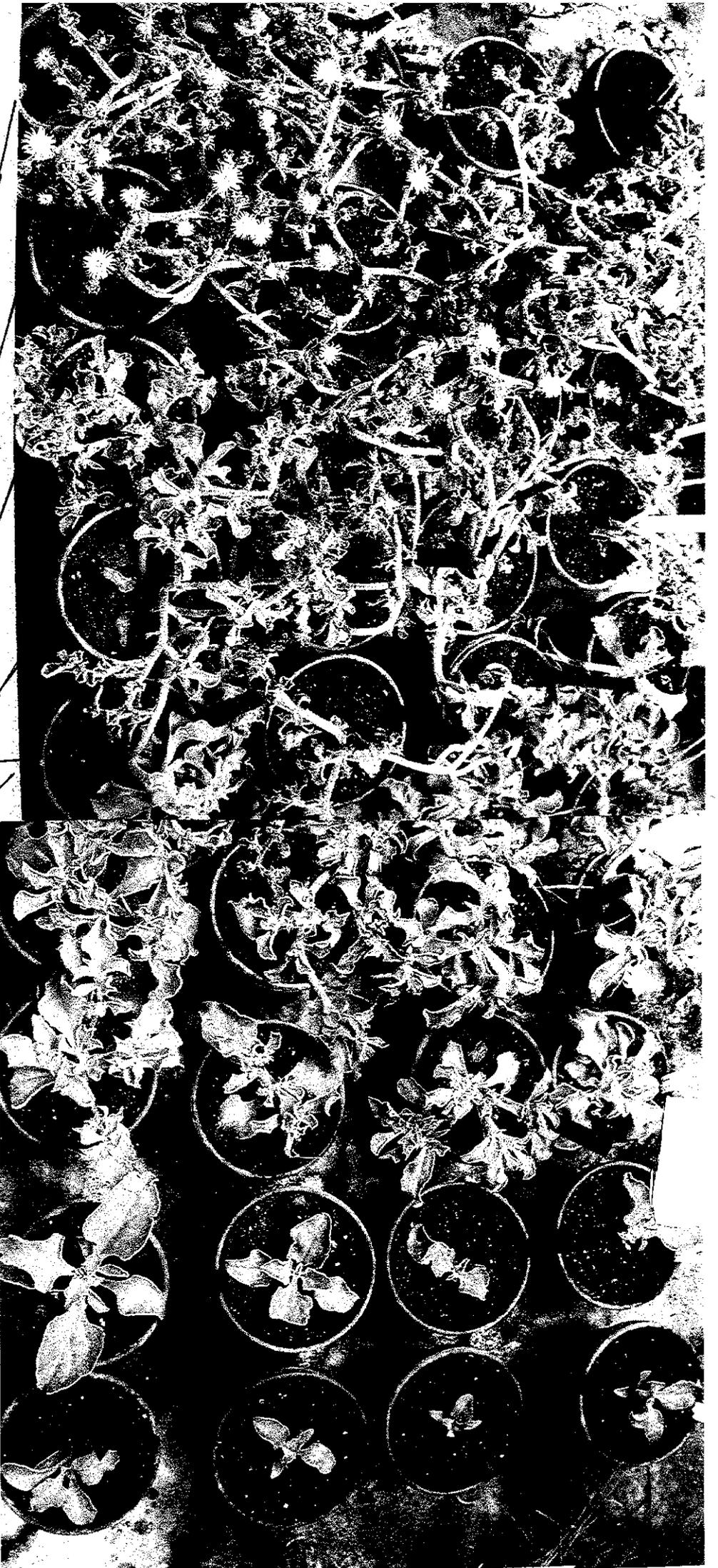


Bild 8: Hier sind die 4 Altersreihen zu sehen, an denen wir die Experimente durchgeführt haben (Foto vom 09.02.2001)
Das Alter der Pflanzen (nach Saat) sinkt von links nach rechts (24.10.00; 07.11.00; 14.21.28.11.00; 05.15.27.12.00; 05.01.01)
Die horizontalen Reihen von oben nach unten: 1. Referenz (unbehandelt) 2. Hitze- und Salzstreß 3. nur Salzstreß 4. nur Hitzestreß
Die vertikalen Reihen stellen jeweils das gleiche Alter dar.



Bild 9: Pflanzen vom 28.11.2001 (von links nach rechts: Hitze und Salzstress; Hitzestress; Salzstress) im Alter von 73 Tagen (Foto vom 09.02.2001). CAM ist, insbesondere bei den salz- und salz- und thermogestressten Pflanzen stark ausgeprägt.