

PAM-MESSUNGEN ZUR BESTIMMUNG DES „NON PHOTOCHEMICAL QUENCHING“

Exkursion AlpFlix SS13 18.07. – 22.07.2013

Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen

Nadine Silber, Corinna Metzler, Alicia Engelbrecht



Inhalt

1	Einleitung.....	- 2 -
1.1	Photosynthese („photochemical quenching“)	- 2 -
1.2	„Non-photochemical quenching“ (NPQ)	- 4 -
1.3	Theorie der PAM-Messung (Pulse-Amplitude-Modulated Fluorescence)	- 6 -
2	Material und Methoden	- 10 -
3	Ergebnisse.....	- 12 -
4	Diskussion.....	- 13 -
5	Optimierungsvorschläge des Versuchs	- 15 -
6	Literatur	- 16 -

1 Einleitung

1.1 Photosynthese („photochemical quenching“)

Photosynthese kann als Prozess definiert werden, bei dem mit Hilfe von Strahlungsenergie organische Substanzen aus Kohlendioxid und Wasser aufgebaut werden. Dabei unterteilt man die Photosynthese in Licht- und Dunkelreaktion (Calvinzyklus).

Bei der Lichtreaktion, die in den Thylakoiden der Chloroplasten abläuft, kommt es zur Umwandlung elektromagnetischer Energie in metabolisch nutzbare Energie in Form von ATP und $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Diese werden für die im Stroma stattfindende Dunkelreaktion benötigt. Bei der Dunkelreaktion wird Kohlendioxid über den Calvinzyklus in der Pflanze fixiert und Kohlenhydrate synthetisiert.

Die Absorption von Licht, mit geeigneter Wellenlänge erfolgt mit Hilfe der Chloroplastenpigmente. Zu den wichtigsten Pigmenten höherer Pflanzen gehören Chlorophyll *a* und *b* und verschiedene Carotinoide. Diese bilden einen Komplex, der aufgrund seiner Antennenfunktion light harvesting complex (LHC) genannt wird. Jedoch gehören nicht alle Chl-*a*-Moleküle diesem Komplex an, da die photochemisch aktiven Chl-*a*-Moleküle, im sogenannten Reaktionszentrum zu finden sind. Die Absorption der Photonen durch den LHC und die Übertragung dieser auf das Reaktionszentrum ist der grundlegende Mechanismus zum Antrieb des nicht-zyklischen Elektronentransportes.

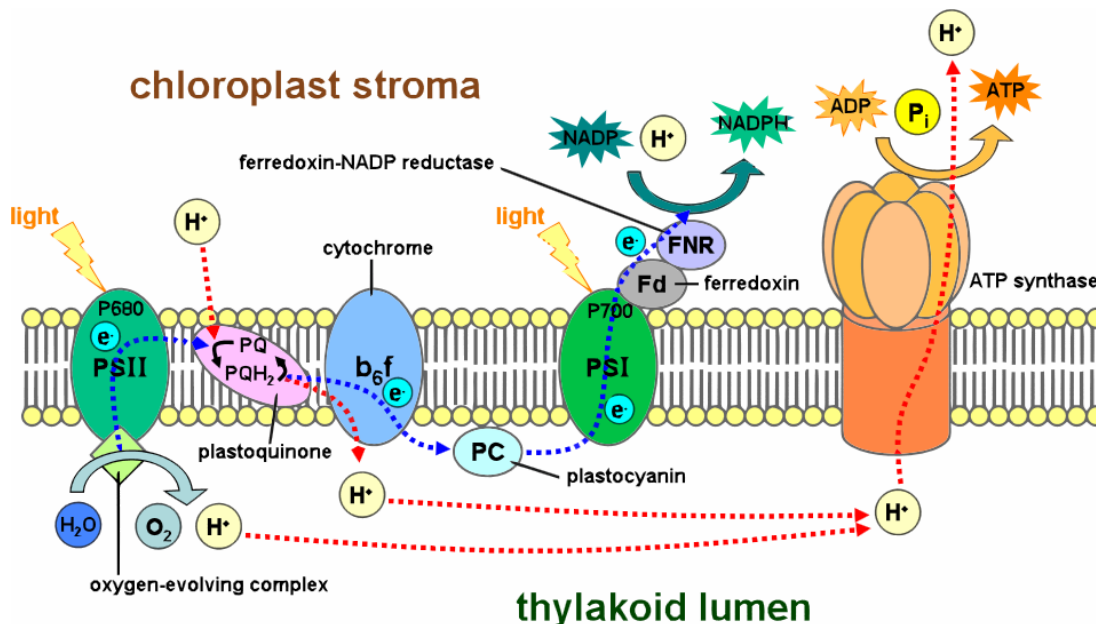


Abbildung 1: Anordnung und Schema der Komplexe, die für die Photosynthese benötigt werden (Komplexe sind innerhalb der Thylakoidmembran angeordnet).

Der bei der Lichtreaktion ablaufende Elektronentransport vom Wasser zu NADP^+ wird durch verschiedene membrangebundene Proteinkomplexe katalysiert, die in der Thylakoidmembran der

Chloroplasten eingebettet und durch mobile Elektronencarrier verbunden sind. Die wichtigsten Komponenten sind dabei die zwei Photosysteme PSI und PSII, die sich aus einem lichtsammelnden Antennenkomplex (LHC) und einem Reaktionszentrum zusammensetzen, der Cytochrom_{b₆/f}-Komplex und die ATP-Synthase. Der Cytochrom_{b₆/f}-Komplex, wie auch die mobilen Elektronencarrier, Plastochinone (PQ) und Plastocyanin (PC) verknüpfen die beiden Photosysteme miteinander.

Der nicht zyklische Elektronentransport beginnt im PSII. Durch Absorption von Photonen geht das Chl-*a* Dimer im Reaktionszentrum in einen angeregten Zustand über und ist jetzt in der Lage Elektronen weiterzugeben. Pheophytin ist der primäre Elektronenakzeptor, welches dem Dimer ein Elektron entzieht. Chl-*a* wird dabei oxidiert und ist nun bestrebt diese Elektronenlücke wieder zu schließen. Ein Enzym, das auf der Lumenseite mit dem Photosystem II assoziiert ist katalysiert die Photolyse des Wassers, wobei dem Wasser zwei Elektronen entzogen werden. Die vier Manganatome des wasserspaltenden Komplexes fungieren dabei als Elektronenspeicher von maximal vier Elektronen, wobei das oxidierte P680 (oxidiertes PSII) diesem sequentiell Elektronen entnimmt. Erst wenn der Elektronenspeicher leer ist, wird dieser in einem Schritt, durch Spaltung von zwei H₂O-Molekülen, wieder aufgefüllt. Bei dieser Spaltung entsteht 1 O₂-Molekül und gleichzeitig werden 4 Protonen auf der Lumenseite frei, die zum Aufbau des pH-Gradienten beitragen. Durch das Mangan-Cluster wird die Entstehung von Sauerstoffradikalen verhindert. Pheophytin gibt das Elektron anschließend an das Plastochinon Q_A weiter und dieses dann an Q_B. Plastochinone sind jedoch in der Lage 2 Elektronen und 2 Protonen aufzunehmen (Hydrochinon). Die Protonen stammen dabei aus dem Stroma und werden diesem somit entzogen. Pheophytin und Q_A sind fest an PSII gebunden. Jedoch ist Q_B im reduzierten Zustand in der Lage sich von PSII zu lösen und fungiert somit als Elektronenübermittler zwischen PSII und dem Cytochrom_{b₆/f}-Komplex. Am Cytochrom_{b₆/f}-Komplex wird das Plastohydrochinon oxidiert, indem es die Elektronen an den Komplex abgibt. Die Protonen werden nicht aufgenommen, sondern lediglich im Lumen freigesetzt. Je ein Elektron wird von FeS_R (Rieske-Protein) und Cytochrom b (Cytb) aufgenommen. Der Q-Zyklus des Cytchrom_{b₆/f}-Komplexes, der über Cytb abläuft, ermöglicht, dass eine höhere Anzahl von Protonen vom Stroma in das Lumen überführt werden können. Cytb reduziert dabei ein Plastochinon zu einem Semichinon, welches dann durch ein weiteres reduziertes Cytb und einer Aufnahme von zwei Protonen aus dem Stroma, zu einem Plastohydrochinon wird. Das Rieske-Protein überträgt sein Elektron weiter auf Plastocyanin, ein mobiler Elektronencarrier, der auf der Lumenseite der Thylakoide mit der Membran assoziiert ist und den Cyt-_{b₆/f}-Komplex mit PSI verbindet. Das Reaktionszentrum des PSI absorbiert im Gegensatz zu dem von PSII (680 nm) bei 700 nm, also in einem langwelligeren Bereich. Das durch das Licht angeregte PSI überträgt das Elektron auf Ferredoxin. Das hierbei entstehende Elektronendefizit wird durch das reduzierte Plastocyanin wieder ausgeglichen. Der letzte Schritt, der

zur Reduktion von NADP^+ führt wird von der Ferredoxin-NADP-Reduktase (FNR) katalysiert. Bei dieser Reaktion überträgt das auf der Stroma-Seite lokalisierte reduzierte Ferredoxin die Elektronen auf NADP^+ und es entsteht $\text{NADPH}+\text{H}^+$.

Im Laufe der lichtgetriebenen Elektronentransportkette kommt es ebenfalls zum Aufbau eines Protonengradienten an der Thylakoidmembran, wobei die Protonenkonzentration auf der Lumenseite wesentlich höher ist als auf der Stromaseite. Dieser Protonengradient wird von der ATP-Synthase für die ATP-Synthese genutzt. Aufgrund der Potenzialdifferenz liegt das Bestreben der Protonen darin, diese Differenz auszugleichen und sie werden über die ATP-Synthase ins Stroma transportiert und die Energie wird zur Synthese von ATP genutzt.

So wird sowohl ATP als auch $\text{NADPH}+\text{H}^+$ auf der Stromaseite gebildet, da beide Formen von chemischer Energie (Redoxäquivalent und ATP) bei der anschließenden lichtunabhängigen Dunkelreaktion im Calvin-Zyklus benötigt werden, um CO_2 in Kohlenhydrate umzuwandeln.

Neben dem nicht zyklischen Elektronentransport gibt es auch einen zyklischen Elektronentransport, an dem nur PSI beteiligt ist. PSI wird wie bei einem nicht zyklischen Elektronentransport mit Licht angeregt und die Elektronen werden auf Ferredoxin übertragen. Jedoch wird Ferredoxin nicht dazu benutzt NADP^+ zu reduzieren, sondern dient wieder zur Reduktion von Plastochinon. Plastochinon kann dann wieder über den Cyt- b_6/f -Komplex und Plastocyanin die Elektronen an PSI abgeben. Somit kommt es nicht zur $\text{NADPH}+\text{H}^+$ -Bildung, sondern ausschließlich zum Aufbau eines pH-Gradienten zur ATP-Synthese (Bresinsky & Strasburger 2013).

1.2 „Non-photochemical quenching“ (NPQ)

Pflanzen müssen die überschüssige Lichtenergie, die nicht in der Photosynthese verwendbar ist, in anderer Form abgeben. Dieser Prozess wird als non-photochemical quenching bezeichnet und beinhaltet die Wärmeabgabe und die ATP-Synthese über den Aufbau eines pH-Gradienten. Dieser Schutzmechanismus ist essentiell um die Pflanze vor oxidativen Schädigungen durch Sauerstoffradikale zu schützen. Wenn Energie nicht mehr allein durch Excitonttransfer und Photochemie abgeführt werden kann, können die überschüssigen Photonen die Photosysteme schädigen, da angeregte Chlorophyllmoleküle im Reaktionszentrum auch Sauerstoff anregen (oxidieren) und es so zur Bildung von toxischen Produkten (z.B. Superoxid O_2^- , Peroxid H_2O_2) kommt. Diese reaktiven Sauerstoffspezies haben dann zur Folge, dass Lipide, Proteine und Membranen geschädigt werden. Damit eine effiziente Photosynthese unter natürlichen Verhältnissen

gewährleistet werden kann, müssen Schutzmechanismen starke Schwankungen in den Lichtintensitäten kompensieren können, um solche oxidative Schädigungen zu verhindern. Unter non-photochemical quenching versteht man die Prozesse, die die Fluoreszenzquantenausbeute auf Grund nicht photochemischer Prozesse verringert.

Parameter für non-photochemical quenching

Fv/Fmax (Y(II)):

Der Quotient F_v/F_{max} beschreibt die maximale photochemische Quantenausbeute von PSII und wird auch als Yield bezeichnet. Unter Quantenausbeute versteht man das Verhältnis zwischen der Anzahl der absorbierten Photonen und der daraus folgenden Fluoreszenz. Der Quotient gibt somit an, wie viel der Lichtenergie effektiv für die Photosynthese verwendet werden kann. Bei ungestörten Systemen ergeben sich Werte zwischen 0,75- 0,85. Bei Werten unter 0,75 ist die Pflanze UV-Stress ausgesetzt. Ihre Photosyntheseleistung sinkt, da die Pflanze die überschüssige Lichtenergie in anderer Form abgeben muss, und deshalb keine optimale Photosynthese mehr betreiben kann. Diese Abgabe (non-photochemical quenching) dient dem eigenen Schutz und kann in Form von Fluoreszenz, Wärme und dem Aufbau eines pH-Gradienten erfolgen.

NPQ:

NPQ hängt mit der nicht photochemischen Löschung der Strahlungsenergie durch den Aufbau eines pH-Gradienten über der Thylakoidmembran und dem Xantophyll-Zyklus zusammen. Im Vergleich zu anderen Fluoreszenzparametern setzt die Berechnung des NPQ immer eine Messung der Pflanze nach Dunkeladaption sowie nach Belichtung voraus. Fluoreszenzlöschung und die Anzahl der fluoreszenzlöschenden Pigmente in den photosynthetischen Antennen sind proportional zueinander.

Y(NPQ):

Beschreibt die Ausbeute der nicht photochemische Fluoreszenzlöschung aufgrund der Funktion der Antennenkomplexe.

Y(NO):

Beschreibt die Ausbeute der nicht photochemische Fluoreszenzlöschung, die nicht auf der Runterregulation der Antennenkomplexe basiert.

$Y(NO)$ und $Y(NPQ)$ beschreiben also die Ausbeute der nicht-photochemischer Fluoreszenzlöschung (des non-photochemical quenchings). $Y(NPQ)$ quantifiziert den Teil von Strahlungsenergie, der als Wärme über UV-Schutzmechanismen abgeleitet wird; die Leistung aller anderen

nicht-photochemischen strahlungsenergieabbauenden Prozesse werden von dem Parameter $Y(NO)$ wiedergegeben.

So ergeben die Ausbeuten der Photochemie (also die maximale Fluoreszenzquantenausbeute des PS II) und die der nicht-photochemischen Löschung zusammen 1 (Junior PAM Manual 2007).

$$Y(II) + Y(NPQ) + Y(NO) = 1$$

Stern-Volmer type non-photochemical fluorescence quenching (Bilger and Björkman, 1990)

$$NPQ = \frac{F_M}{F'_M} - 1$$

Quantum yield of non-light induced non-photochemical fluorescence quenching (Kramer et al. 2004)

$$Y(NO) = \frac{1}{NPQ + 1 + q_L \cdot \left(\frac{F_M}{F_0} - 1\right)}$$

Quantum yield of light-induced (ΔpH and zeaxanthin-dependent) non-photochemical fluorescence quenching (Kramer et al. 2004)

$$Y(NPQ) = 1 - Y(II) - Y(NO)$$

Abbildung 2: Formeln zur Berechnung des NPQ (non-photochemical quenching), des $Y(NPQ)$ und des $Y(NO)$

1.3 Theorie der PAM-Messung (Pulse-Amplitude-Modulated Fluorescence)

Allgemeines

Mittels der Messung der Chlorophyllfluoreszenz ist es möglich, den Einfluss von natürlichen Stressoren, wie Temperatur, Licht und Trockenheit, auf die physiologische Aktivität der Pflanze nachzuweisen. Das Sonnenlicht, das von PSII absorbiert wird, wird teilweise wieder als Chlorophyllfluoreszenz abgegeben. Dieser Teil der Energie kann also nicht für die Bildung von Reduktionsäquivalenten wie NADPH, (das für den Calvin-Zyklus benötigt wird), verwendet werden. Die Intensität der Chlorophyllfluoreszenz ist teilweise umgekehrt proportional zur photosynthetischen Aktivität (Lavorel & Etienne 1977).

Die Lichtenergie, die durch Chlorophyllmoleküle absorbiert worden ist, wird zum Betreiben der Photosynthese benutzt, als Wärme deaktiviert oder als Fluoreszenzlicht abgestrahlt. In einem theoretisch optimalen Zustand gehen ungefähr 80 % Wärme und 0,5 % in Form von Fluoreszenzlicht

verloren. Ist die Nutzung der Energie in der photosynthetischen CO₂-Fixierung nicht möglich, werden z.B. 97,5 % als Wärme und 2,5 % als Fluoreszenz abgestrahlt. Die Fluoreszenz erfolgt hauptsächlich durch die Chlorophyll-*a*-Moleküle im Photosystem II (PSII) der Elektronentransportkette (H.R. Bolhar-Nordenkampf et al. 1989).

Zur Messung des „non-photochemical quenching“, also der nicht-photochemischen Löschung werden PAM-Messungen (Pulse-Amplitude-Modulated Fluorescence Messungen) mithilfe der sogenannten „saturating pulse method“ durchgeführt. Solche kurzen saturierenden Pulse sind essentiell, um Veränderungen der Fluoreszenz bei Dunkel- bzw. Lichtadaption der Pflanze zu detektieren. Im Gegensatz zu anderen Messapparaturen messen PAM-Fluorometer nur die Fluoreszenz, die aus solch einem saturierenden Puls resultiert. Die Fluoreszenz, die von einer kontinuierlichen Bestrahlung hervorgerufen wird, wird nicht gemessen. Dies erlaubt dauerhafte Bestrahlung um die Fluoreszenzausbeute in photosynthetischen Membranen zu manipulieren und so „saturating pulse analyses“ durchzuführen. PAM Fluorometer messen also lediglich die Höhe von Fluoreszenz-Peaks, die durch Impulse der Lichtquelle hervorgerufen werden. Bei konstantem Erregerimpuls und unter der Voraussetzung, dass die optischen Eigenschaften von Chlorophyll während der Messungen konstant bleiben, ist das Signal, das vom PAM-Fluorometer aufgezeichnet wird proportional zur Fluoreszenzausbeute (Junior PAM Manual 2007).

„Saturating Pulse Analysis“

Die Abnahme der Fluoreszenzausbeute, die durch eine erhöhte Photochemie (also Photosynthese) verursacht wird, wird als photochemische Fluoreszenzlöschung oder photochemische Löschung bezeichnet. Alle anderen Änderungen der Fluoreszenzausbeute sind auf die Umwandlung der Energie in Wärme und den Aufbau eines pH-Gradienten zurückzuführen und werden als nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung zusammengefasst. Die „saturating Pulse Analysis“ (saturierende Pulsanalyse) wurde entwickelt, um zwischen den beiden Fluoreszenzlöschungsmechanismen zu unterscheiden und diese zu messen.

Bei Dunkelheit sind alle PSII-Zentren im offenen Zustand und können somit Anregungsenergie mit maximaler Effizienz für die Photochemie verwenden. Die photochemische Löschung ist somit maximal und die Photosynthese läuft bei maximaler Ausbeute ab. Ein saturierender Puls (SP) bedeutet, dass das Anregungslicht stark und lang genug ist, um die Elektronentransportkette zwischen den beiden Photosystemen völlig zu reduzieren, sodass es PSII an Elektronenakzeptoren mangelt. Bei Abwesenheit von Elektronenakzeptoren können die PSII-Reaktionszentren keine photochemische Arbeit leisten und werden geschlossen, sodass die Photosynthese zum Stillstand

kommt. Unter diesen Bedingungen werden maximale Fluoreszenzlevel erreicht, die als F_m und F_m' bezeichnet werden (siehe Abb. 3).

Dunkelrotes Licht wird bevorzugt vom PSI absorbiert und nur zu einem sehr geringen Teil vom PS II. So werden vom PSI schnell Elektronen aus der Elektronentransportkette zwischen den beiden Photosystemen abgezogen, was wiederum zum schnellen Öffnen der Reaktionszentren von PS II führt und so eine maximale photochemische Löschung (Photosynthese) ablaufen kann. Die daraus resultierende minimale Fluoreszenz in der dunkel-adaptierten Pflanze wird als F_0' bezeichnet.

Während der Belichtung mit photochemisch aktivem Licht, wird über der Thylakoidmembran ein Protonengradient (ΔpH) aufgebaut und Xanthophyll bzw. Zeaxanthin synthetisiert. Der Protonengradient, sowie die Zeaxanthin-Konzentration sind wichtige Faktoren für die Stimulation der nicht-photochemischen Löschung.

Von wichtiger Bedeutung ist, dass durch Bestrahlung mit dunkelrotem Licht die Photosynthese unterbrochen wird, denn dann wird nur das PSI angeregt und die Elektronen werden vom PSII abgezogen, sodass dieses sich öffnet. Dieser Zeitpunkt repräsentiert also das minimale Fluoreszenzlevel des offenen PSII Reaktionszentrums und repräsentiert im Umkehrschluss eine theoretisch maximale Photosyntheseleistung.

Diese absoluten Fluoreszenzwerte und Fluoreszenzunterschiede bzw. Schwankungen werden verwendet, um den Zustand vom PSII zu messen (wird durch Fluoreszenzquotienten beschrieben). Denn bei maximaler Fluoreszenz läuft kaum Photosynthese ab. Dafür ist zu diesem Zeitpunkt das non-photochemical quenching maximal. Bei minimaler Fluoreszenz des PSII läuft eine maximale Photosynthese ab; das non-photochemical quenching ist dafür minimal. Die Fluoreszenzquotienten werden von dem Programm WinControl-3 kalkuliert und sind in Abb. 3 als Schema dargestellt (Junior PAM Manual 2007).

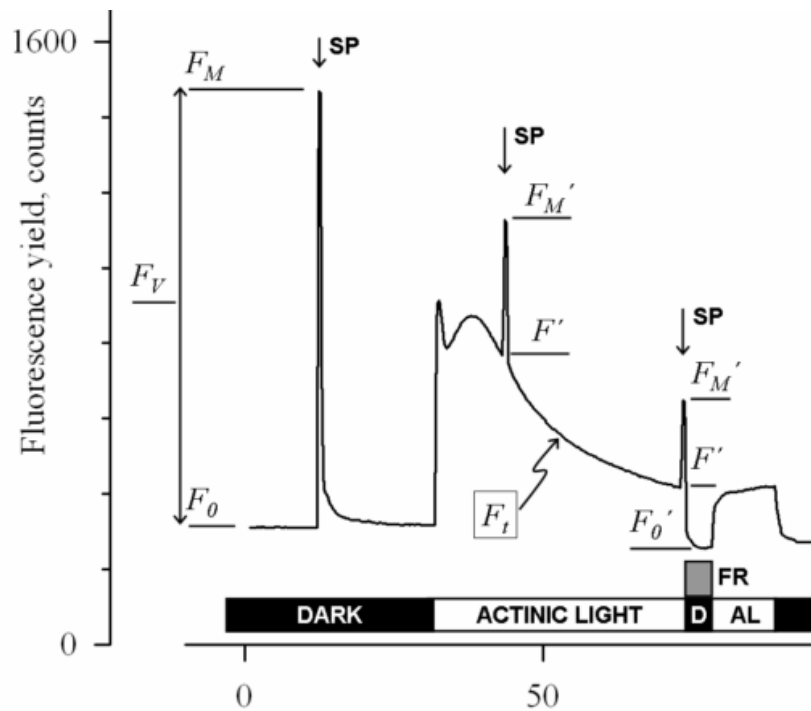


Abbildung 3: Messungen für die "Saturating Pulse Analysis". AL: actinic light (photosynthetisch aktives Licht); D: Dunkel; SP: saturating pulse; FR: far-red illumination (Dunkelrotlicht-Beleuchtung)

Als F_0 -Level wird jene minimale Fluoreszenzrate bezeichnet, welche bei maximal oxidiertem Q_A (=primärer Quencher des PSII) (Duysens et al 1961) eine optimale photochemische Nutzung des einfallenden Lichts ermöglicht. Die Fluoreszenzlöschung, das heißt eine Verminderung der Fluoreszenz, im englischen als „quenching“ bezeichnet, ist einerseits bedingt durch die photochemische Nutzung der Energie, andererseits durch die Wärmeabgabe und den Aufbau eines pH-Gradienten. F_0 wird als Bezugsgröße für die anderen Hauptpunkte der Kurve herangezogen.

Bei Belichtung mit starkem Erregerlicht in Form eines saturierenden Pulses steigt die Fluoreszenz nach dem Erreichen des F_0 -Levels innerhalb von 1 – 2s auf einen maximalen Wert, F_m an. Zu diesem Zeitpunkt ist Q_A völlig reduziert, d.h. die Elektronentransportkette kann keine Elektronen aufnehmen und die einfallende Lichtenergie wird nur über Wärme und Fluoreszenz deaktiviert und kann nicht photochemisch genutzt werden. Die Fluoreszenzlöschung wird hier nur durch die Wärmeabgabe bestimmt. Die Differenz zwischen F_0 und F_m wird als variable Fluoreszenz F_v bezeichnet und als Verhältnis F_0/F_m angegeben. Bei ungestörten Systemen ergeben sich Werte von 0,75-0,85. Der Wert F_v/F_m ist daher ein gutes Maß für mögliche Störungen der photochemischen Lichtnutzung (Bolhar-Nordenkamp et al. 1988).

2 Material und Methoden

Die Messungen wurden mit einem Junior PAM Chlorophyll Fluorometer durchgeführt. Zur Messung an der Pflanze wurde ein Blatt zwischen zwei Magneten eingeklemmt (wichtig: keine Blattadern treffen!). Durch eine Öffnung im oberen Magnet führt ein Glasfaserkabel zum Gerät, durch welches die Lichtimpulse zum Blatt der Pflanze geleitet werden. Die Messdaten wurden auf einem Laptop im Feld ermittelt.

Durchgeführt wurden die Versuche im Gebiet der AlpFlix im Kanton Graubünden, Schweiz. Um vergleichbare Messergebnisse erhalten zu können wurden jeweils zwei Pflanzen der Art *Fragaria* (Erdbeere) in drei verschiedenen Höhenzonen ausgesetzt. Die ersten Pflanzen befanden sich in ca. 2200 Höhenmetern (Höhenstufe A), die zweite Höhenstufe (B) wurde auf 2000m gesetzt. Weitere Pflanzen wurden auf etwa 1800 (C) und 1600 (D) Höhenmetern ausgebracht. Vor der Messung waren die Pflanzen bereits drei Tage den standortbedingten Lichtverhältnissen ausgesetzt (die Pflanzen wurden am 16.07.2013 ausgesetzt; Messungen fanden am 19.07.2013 statt). Vor den Messungen wurden die Pflanzen für 30min abgedunkelt. Nach der Verdunklungszeit wurde das Blatt in die Apparatur eingespannt und pro Pflanze jeweils 3 Messungen durchgeführt.



Abbildung 4: Standort D (auf ca. 1600 Höhenmetern); links: aufgebaute Apparatur zur Abdunkelung der Pflanzen; rechts: Messungen mittels Junior-PAM nach 30 minütiger Verdunkelung der Versuchspflanzen.



Abbildung 5: Aufbau der Apparatur (Junior-PAM) mit eingespanntem Blatt.

3 Ergebnisse

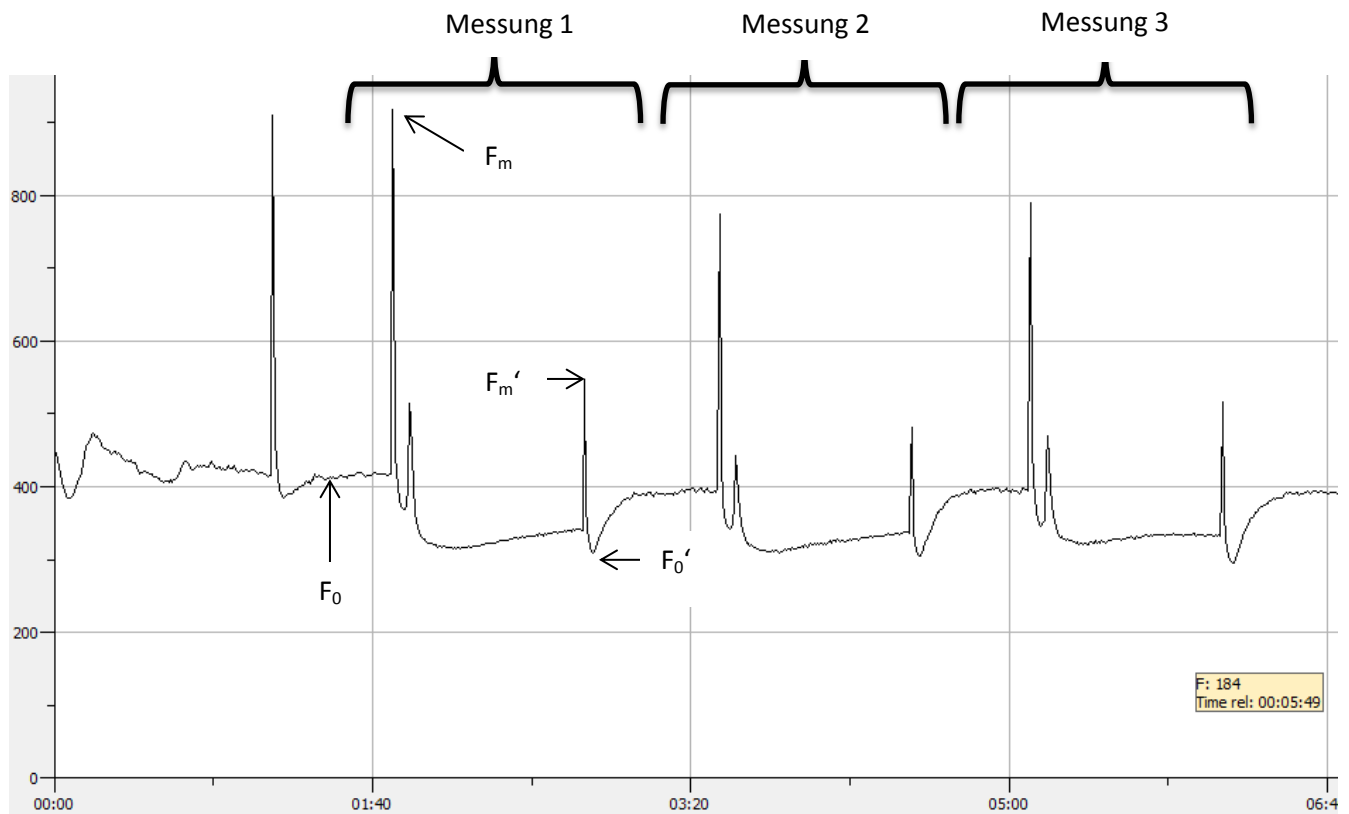


Abbildung 6: Verlauf der PAM-Messung bei der Erdbeere C2 (auf 1800m); es wurden drei Messungen durchgeführt

Abbildung 6 zeigt den Verlauf einer Messung. Der erste Ausschlag durch einen saturierenden Puls dient der Eichung. Anschließend folgen drei Durchläufe der programmierten Messung mit der Junior-PAM. Die folgenden Tabellen zeigen die Messergebnisse.

Tabelle 1: NPQ, Y(NO), Y(NPQ) und F_v/F_{max} von Wundklee und Erdbeerpflanze auf einer Höhe von 2 200m.

Höhenstufe A: 2 200m	1:NPQ	1:Y (NO)	1:Y (NPQ)	F_v/F_{max} 16.07.2013	F_v/F_{max} 19.07.2013
Erdbeere A1	0,5395	0,27775	0,1545	0,726	0,421
Erdbeere A2	-0,308	0,7043	-0,237	0,435	0,35
Wundklee A1	0,0645	2,123	0,0725	--	0,685
Wundklee A2	0,3121	0,328	0,0738	--	0,73

Der negative Wert muss ein Messfehler sein, da ansonsten F_m' größer sein müsste als F_m .

Tabelle 2: NPQ, Y(NO), Y(NPQ) und F_v/F_{max} von Wundklee und Erdbeerpflanze auf einer Höhe von 2000m.

Höhenstufe B: 2 000m	1:NPQ	1:Y (NO)	1:Y (NPQ)	F_v/F_{max} 16.07.2013	F_v/F_{max} 19.07.2013
Erdbeere B1	0,1536	0,336	0,075	0,74	0,457
Erdbeere B2	0,236	0,2855	0,112	0,732	0,368

Tabelle 3: NPQ, Y(NO), Y(NPQ) und F_v/F_{max} von Wundklee und Erdbeerpflanze auf einer Höhe von 1800m.

Höhenstufe B: 1 800m	1:NPQ	1:Y (NO)	1:Y (NPQ)	F_v/F_{max} 16.07.2013	F_v/F_{max} 19.07.2013
Erdbeere C1	0,498	0,259	0,165	0,784	0,556
Erdbeere C2	0,426	0,328	0,171	0,746	0,55
Wundklee C1	0,158	0,3538	0,064	--	0,654
Wundklee C2	0,424	0,338	0,0985	--	0,635

Tabelle 4: NPQ, Y(NO), Y(NPQ) und F_v/F_{max} von Wundklee und Erdbeerpflanze auf einer Höhe von 1600m.

Höhenstufe B: 1 600m	1:NPQ	1:Y (NO)	1:Y (NPQ)	F_v/F_{max} 16.07.2013	F_v/F_{max} 19.07.2013
Erdbeere D1	0,277	0,383	0,106	--	0,618
Erdbeere D2	-0,0858	0,5941	-0,08433	0,493	0,68

4 Diskussion

Zu erwarten wäre gewesen, dass Pflanzen bei zunehmender Höhenlage mehr non-photochemical Quenching betreiben, da die UV-Strahlenbelastung in der Höhe zunimmt.

NPQ

Zwischen der ersten Höhenstufe (2200m A) und der Zweiten (2000m B) sieht man bei den Erdbeerpflanzen eine deutliche Abnahme des NPQ. Dies bedeutet, dass die Pflanzen in der höheren Lage einem größeren UV-Stress ausgesetzt sind und deshalb mehr non-photochemical quenching betreiben müssen, um sich vor der Strahlungsenergie zu schützen. Auf 1800m nimmt der NPQ entgegen der Erwartungen wieder zu, erreicht allerdings nicht den Wert der Erdbeerpflanzen auf 2200m. Eine Erklärung hierfür ist, dass die Messungen auf der dritten Höhenstufe C mit Pflanzen durchgeführt wurden, die auf einer Waldlichtung standen. Die Pflanzen waren also nicht konstant im

vollen Sonnenlicht, sondern teilweise im Schatten der Bäume, wo sie oft nur von dunkelrotem Licht bestrahlt wurden oder durch die Standortbedingungen eher an Schatten adaptiert waren. Auf der niedrigsten Höhenstufe (1600m C) erkennt man eine starke Abnahme des NPQ im Vergleich zu den anderen Messdaten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Pflanzen hier im Vergleich weniger UV-Licht ausgesetzt sind.

Vergleicht man den Wundklee mit den Erdbeerpflanzen, stellt man fest, dass der Wundklee auf 2200m einen deutlich geringeren NPQ-Wert hat. Er kommt hier natürlich vor und ist somit viel besser an die vorherrschenden Bedingungen angepasst. Die Erdbeerpflanzen dagegen hatten nur drei Tage um sich an die vorherrschenden Bedingungen anzupassen. Somit stehen sie nicht nur unter UV-Stress, sondern sind auch die Temperatur- Wind- und Regenbedingungen dieser Höhenstufe nicht gewohnt. Der Wundklee ist gut angepasst, dass er nicht so viel Energie für non-photochemical quenching erübrigen muss, sondern eine effektivere Photosynthese betreiben kann. Geht man auf 1800m findet keine nennenswerte Änderung der Werte statt, was möglicherweise wieder auf die nicht konstante und gleichmäßige Belichtung im Wald zurückzuführen ist. Der Wundklee wird im Wald (am Hang) während des Tages weniger und nur zu bestimmten Zeiten belichtet im Vergleich zum Wundklee auf freiem Feld auf 2200m. Deshalb ist er im Wald nicht an starkes Sonnenlicht angepasst und muss so mehr non-photochemical quenching zum UV-Schutz betreiben.

F_v/F_m

Die Messergebnisse zeigen deutlich, dass mit zunehmender Höhenlage der Quotient F_v/F_m abnimmt. Auf einer Höhe von 2200m ergeben sich bei den beiden Erdbeerpflanzen Werte von 0,35 und 0,421. Auf 1600m ergeben sich Werte von 0,68 und 0,618. Das bedeutet, dass die Photosyntheseleistung bei Pflanzen in dieser Höhenlage höher ist. Die Messergebnisse stimmen also mit den Erwartungen überein. Die Werte liegen alle unterhalb des Normalwertes ungestörter Systeme (0,75-0,85). Alle Erdbeerpflanzen auf den unterschiedlichen Höhen stehen also unter UV-Stress. Dies ist damit zu erklären, dass die Erdbeerpflanzen nicht an solche Höhen und die dort vorherrschenden Lichtbedingungen angepasst sind. Selbst die drei Tage Anpassungszeit, die die Erdbeerpflanzen hatten, haben nicht genügt, um unter UV-Stressbedingungen optimale Photosyntheseleistungen zu erzielen.

Y(NPQ) und Y(NO)

Der Anteil des non-photochemical quenchings, der in Form von Wärme (Y(NPQ)) abgegeben wird ist immer geringer als der, der zum Aufbau des pH-Gradienten (Y(NO)) verwendet wird (siehe Tabelle 1-4). Die Pflanzen nutzen die überschüssige Energie also eher zum Aufbau eines ΔpH , als dass sie sie in Form von Wärme abgeben. Energie, die in Form von Wärme abgegeben wird, hat für die Pflanze keinerlei Nutzen. Der Aufbau des pH-Gradienten hingegen dient der Synthese von ATP und liefert der Pflanze somit metabolisch nutzbare Energie. In den Tabellen 1 und 3 sieht man, dass die Differenz zwischen Y(NPQ) und Y(NO) beim Wundklee deutlich größer ist als bei den Erdbeerpflanzen. Der Wundklee gibt verhältnismäßig weniger Energie in Form von Wärme ab, als er in den Aufbau des pH-Gradienten investiert. Der Wundklee ist also besser an die Standortbedingungen angepasst, als die Erdbeerpflanzen, die durch die Aufzucht im Baumarkt eher an Schattenbedingungen adaptiert sind. Der Wundklee hat also mehr PSI, das für den zyklischen Elektronentransport und somit zur ATP-Synthese benötigt wird.

5 Optimierungsvorschläge des Versuchs

Um aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten, könnte man folgende Optimierungen des Versuchs vornehmen. Zunächst sollte darauf geachtet werden, dass alle Pflanzen, die im Versuch verwendet werden möglichst unter den gleichen Bedingungen gewachsen sind wie die Pflanzen in den verschiedenen Höhenzonen. Dazu sollten die Pflanzen für einen bestimmten Zeitraum vor der Durchführung des Versuchs in den jeweiligen Höhenzonen ausgesetzt werden. Für eine noch optimalere Anpassung an den jeweiligen Standort könnte man die Samen der Versuchspflanzen in den verschiedenen Höhenzonen aussäen. Als Vergleichspflanze sollte eine Pflanze gewählt werden, die in allen Höhenzonen vorkommt. Während den Messungen an sich sollte darauf geachtet werden, dass gleiche Bedingungen bezogen auf Temperatur, Sonneneinstrahlung, Tageszeit, Bodenfeuchtigkeit und Wind herrschen. Zudem sollte in den verschiedenen Höhenzonen jeweils eine größere Anzahl an Pflanzen gemessen und mehrere Messungen pro Pflanze durchgeführt werden. Eventuell könnte man die Verdunkelungszeit vor den Messungen verlängern. Des Weiteren wäre es sinnvoll die Versuchsreihe über einen längeren Zeitraum durchzuführen.

6 Literatur

Junior PAM Manual.pdf

Bresinsky A, Strasburger E. 2013. Lehrbuch der Botanik.

Duysens LNM, Amesz J, Kamp BM. 1961. Two Photochemical Systems in Photosynthesis. *Nature* 190: 510-11

Lavorel J, Etienne A. 1977. In vivo chlorophyll fluorescence. *Primary processes of photosynthesis 2*: 203-68

Pflanzenphysiologische Vorlesung im Modul Molekulare Biologie II WS 12/13

H.R. Bolhar-Nordenkamp, S.P. Long, und E.G. Lechner. *Die Bestimmung der Photosynthesekapazität über die Chlorophyllfluoreszenz als Maß für die Stressbelastung von Bäumen*