

Anpassung an UV-Strahlung (Photosynthese und non-photochemical quenching)

Von Anna Zucker, Georg Nauenburg und Franziska Wilhelm

21.06.-25.06.2017



Einleitung

Photosynthese ist ein Prozess, der es Pflanzen ermöglicht Sonnenenergie zu speichern. Diese Speicherung geschieht durch die Umwandlung von Lichtenergie in Stoffwechselenergie. Bei der Photosynthese in höheren Pflanzen ist das Mesophyll der Blätter das Gewebe mit der höchsten Photosyntheseaktivität. Mesophyllzellen besitzen Chloroplasten, welche Chlorophyll enthalten. Das Chlorophyll ist ein lichtabsorbierendes Pigment mit grüner Farbe. Chloroplasten besitzen ein ausgedehntes System aus inneren Membranen, den Thylakoiden. Das gesamte Chlorophyll befindet sich in den Thylakoiden (Schopfer & Brennicke, 2010). Die Pflanzen können Sonnenenergie nutzen um unter Freisetzung von Sauerstoff Wasser zu oxidieren und Kohlendioxid zu organischen Verbindungen, hauptsächlich verschiedenen Zuckern, zu reduzieren (Taiz & Zeiger, 2000). Die Photosynthese beruht auf zwei verschiedenen Reaktionen. Die Lichtreaktion, auch Thylakoidreaktion genannt, und der Dunkelreaktion oder Kohlenstofffixierung. Die Lichtreaktion findet an den Thylakoidmembranen in den Chloroplasten statt. Das Ziel der Lichtreaktion ist die Herstellung der energiereichen Verbindungen ATP und NADPH, diese werden bei der Kohlenstofffixierung zur Zuckersynthese benötigt (Taiz & Zeiger, 2000).

Die Photosynthese findet an Komplexen aus Lichtsammelantennen und photochemischen Reaktionszentren statt. Der Großteil der Pigmentmoleküle fungiert als Antenne und absorbiert das einfallende, photosynthetisch aktive Licht, um es an das Reaktionszentrum, in dem die chemischen Reaktionen ablaufen, weiterzuleiten (Taiz & Zeiger, 2000). Im Reaktionszentrum findet eine Energiespeicherung durch Bildung von chemischen Bindungen statt (Schopfer & Brennicke, 2010). Die Lichtenergie wird von zwei unterschiedlichen funktionellen Einheiten, den sogenannten Photosystemen, umgesetzt. Photosysteme bestehen aus Multiproteinkomplexen und Chlorophyllmolekülen (Schopfer & Brennicke, 2010). Die absorbierte Energie treibt die Übertragung von Elektronen zwischen Elektronendonoren und Elektronenakzeptoren an, was schließlich dazu führt, dass der größte Teil der Elektronen NADP^+ zu NADPH reduziert (Taiz & Zeiger, 2000). Zusätzlich wird die Lichtenergie ebenfalls dazu genutzt, eine protonenmotorische Kraft an der Thylakoidmembran aufzubauen, diese protonenmotorische Kraft wiederum wird zur ATP Synthese genutzt (Taiz & Zeiger, 2000).

Bei der photochemischen Primärreaktion wird die Anregungsenergie eines Elektrons in chemische Energie umgewandelt, das bedeutet, es findet ein Elektronentransfer von einem angeregten Chlorophyllmolekül auf ein Akzeptormolekül statt. Durch die Absorption eines Photons werden die Elektronen im Chlorophyll des Reaktionszentrums neu geordnet und durch die Elektronenübertragung wird ein Teil der Energie des Photons als Redoxenergie gespeichert. Nach dieser photochemischen Reaktion liegt das Chlorophyll im Reaktionszentrum in einem oxidierten und der Elektronenakzeptor in einer reduzierten Form vor. Also ist im positiv geladenen, oxidierten Chlorophyll des

Reaktionszentrums im energieärmeren Orbital eine Elektronenlücke, die ein Elektron aufnehmen kann. Der Akzeptor gibt sein zusätzliches Elektron auf einen sekundären Akzeptor ab, von diesem aus wandert das Elektron entlang der Elektronentransportkette. Das oxidierte Chlorophyll wird durch sekundären Elektronendonoren re-reduziert und dieser wiederum von einem tertiären Donor. Als eigentlicher Elektronendonoren dient das Wasser und als letztendlicher Elektronenakzeptor das NADP^+ (Taiz & Zeiger, 2000).

Die Reaktionsgleichung der Photosynthese lautet $6 \text{CO}_2 + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2$, wobei $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ für Glucose steht, jedoch verschiedene organische Moleküle synthetisiert werden können. Sauerstoff entwickelnde Organismen besitzen zwei Photosysteme, die hintereinander geschaltet sind und durch die oben erwähnte Elektronentransportkette miteinander verbunden sind. Das Photosystem I (PS-I) bildet ein starkes Reduktionsmittel, welches NADP^+ reduzieren kann, während das Photosystem II (PS-II) ein extrem starkes Oxidationsmittel bildet, das Wasser oxidiert. Der intermediäre Elektronenüberträger Cytochrom wird im PS-II reduziert und im PS-I oxidiert. PS-I und PS-II besitzen jeweils ein eigenes Antennensystem und ein eigenes Reaktionszentrum (Schopfer & Brennicke, 2010, Taiz & Zeiger, 2000).

Wie alle biologischen Vorgänge sorgen auch während der Photosynthese verschiedene Regelmechanismen für eine optimale Abstimmung der einzelnen Reaktionen auf ein umweltabhängiges Angebot an Lichtenergie.

Wenn Moleküle Licht absorbieren oder emittieren, ändert sich ihr elektronischer Zustand. Chlorophyll, das sich im Grundzustand befindet (energieärmster Zustand) absorbiert ein Photon und befindet sich dann im angeregten (energiereichen) Zustand. Zwischen diesen beiden Zuständen ändert sich die Elektronenverteilung. Wie in Abbildung 1 dargestellt, erreicht das Chlorophyllmolekül durch Absorption von blauem Licht einen höheren angeregten Zustand, als bei der Absorption von rotem Licht. Photonen mit kürzerer Wellenlänge sind energiereicher. Dieser höhere angeregte Zustand ist jedoch sehr instabil und das Molekül geht schnell in den niedrigsten angeregten Zustand über. Dieser Übergang geschieht durch Wärmeabgabe.

Beim Übergang vom niedrigsten angeregten Zustand in den Grundzustand hat das Molekül verschiedene Möglichkeiten der Energieabgabe. Die Anregungsenergie kann beim Übergang in den Grundzustand als Wärmeenergie abgegeben werden. Möglich ist auch ein Energietransfer, hier überträgt das angeregte Chlorophyll seine Energie auf ein anderes Molekül. Eine weitere Alternative ist die Fluoreszenz. Hierbei wird der Übergang durch Abgabe eines Photons ermöglicht. Das Fluoreszenzsignal zeigt eine etwas höhere Wellenlänge als das absorbierte Photon, da ein Teil der Energie als Wärme abgegeben wird und höhere Wellenlängen energiereicher sind als niedrige (Taiz & Zeiger, 2000).

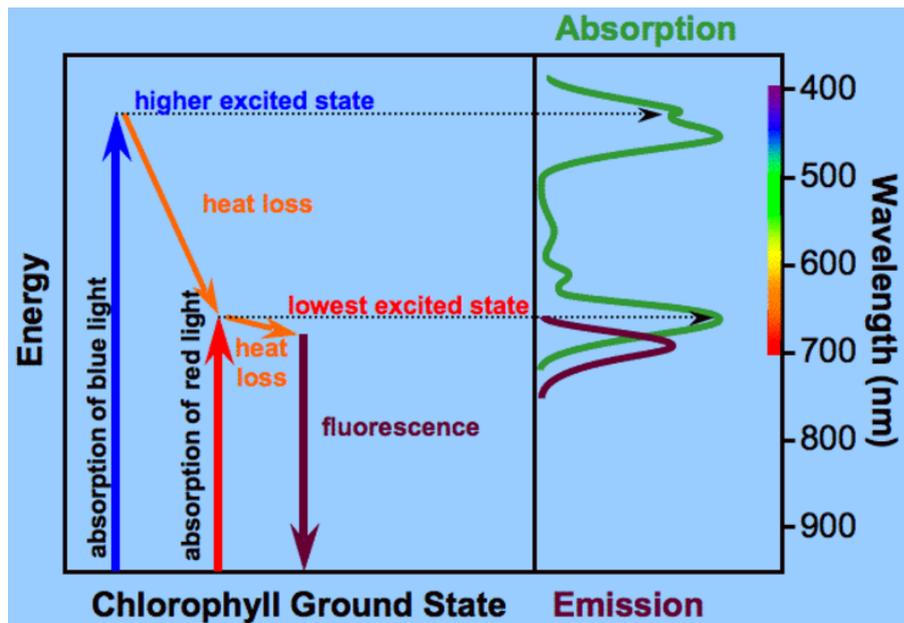


Abb. 1: Lichtabsorption und -emission bei Chlorophyll a.

(http://plantphys.info/plant_physiology/light.shtml)

Pflanzen können unter Starklichteinfall nicht die volle Lichtintensität für die Photosynthese nutzen, dadurch entsteht ein Überschuss an nicht nutzbarer Lichtenergie. Dieser Lichtenergieüberschuss kann zu Reduktion der Photosyntheseaktivität führen (Schopfer & Brennicke, 2010).

Nichtphotochemische Energielöschung oder *nonphotochemical quenching* ist ein bedeutender Regulationsprozess bei der Energieleitung zum Reaktionszentrum. Die Chlorophyllfluoreszenz wird nicht durch photochemische Reaktionen sondern durch andere Prozesse gelöscht. Dieser Vorgang dient dem Schutz des Photosyntheseapparats vor überschüssiger Anregung und daraus folgender Schädigung.

Angeregte Chlorophyllmoleküle können ihren ursprünglichen Energiezustand erreichen, indem sie eine photochemische Reaktion eingehen oder die überschüssige Energie als Wärmeenergie abgeben. Eine dritte Methode ist die Abgabe eines Photons, das durch Fluoreszenz detektierbar ist. Die Chlorophyllfluoreszenz kann mit einem *pulse-amplitude-modulated* (PAM) Fluorometer gemessen werden. Durch Messungen der Chlorophyllfluoreszenz ist es möglich, die Effizienz der Photosynthese zu messen (Buchanan et al., 2015). In den photosynthetischen Membranen resultieren 2-10% der Fluoreszenz aus Chlorophyll a des Photosystems II, daher beziehen sich die Fluoreszenzmessungen mit *pulse-amplitude-modulated* (PAM) Fluorometer auf das PS-II. Die Fluoreszenz wird moduliert durch photochemische Reaktionen und Wärmeabgabe. Der Fluoreszenzrückgang durch gesteigerte photochemische Reaktionen wird als *photochemical quenching* bezeichnet. Als *nonphotochemical quenching* (NPQ) wird ein Fluoreszenzrückgang durch Wärmeabgabe bezeichnet. Mithilfe der *saturating pulse analysis* kann zwischen beiden Möglichkeiten

des *fluorescence quenching* unterschieden werden. Abbildung 2 zeigt eine Fluoreszenzkurve, induziert durch photoaktives Licht. In den Dunkelperioden ist die integrierte Intensität des Lichtimpulses gering und induziert deutlichen Elektronentransport. Daher sind in Dunkelperioden nahezu alle PS-II Reaktionszentren aktiv und verwenden das Anregungslicht mit maximaler Effizienz in photochemischen Reaktionen, das bedeutet unter diesen Konditionen in das *photochemical quenching* maximal. Am Ende der Dunkelperiode und am Ende der Beleuchtung wird ein *saturating pulse* (SP) durchgeführt, diese Belichtung ist stark und lange genug um die Elektronentransportkette zwischen beiden Photosystemen komplett zu reduzieren, das bedeutet im PS-II sind nun keine Elektronenakzeptoren mehr vorhanden. Daher ist nun das PS-II Reaktionszentrum nicht mehr funktionsfähig und der Wert des *photochemical quenching* ist auf dem absoluten Nullwert. Unter diesen Bedingungen werden maximale Fluoreszenzwerte erreicht, F_M für den Maximalwert während der Dunkelperiode und F_M' im belichteten Zustand (Pfündel, 2007).

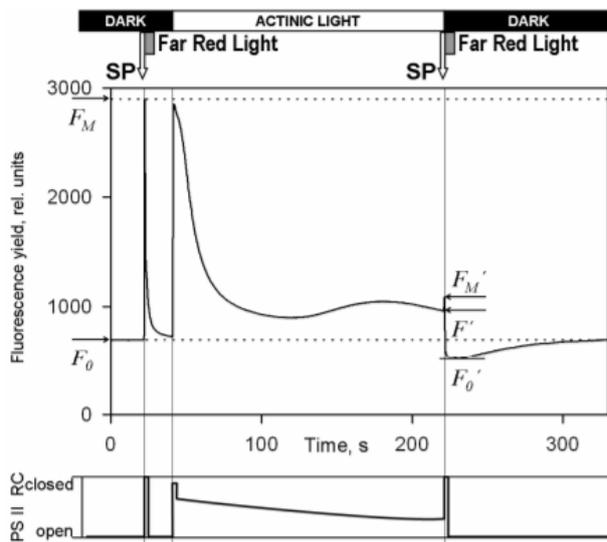


Abb. 2: Chlorophyllfluoreszenzwerte einer PAM Messung mit F_M/F_M' als maximale Fluoreszenzwerte und F_0/F_0' als Minimalwerte der Chlorophyllfluoreszenz; nach Pfündel, 2007, verändert.

Auf jeden SP folgen einige Sekunden hellrotes Licht, welches bevorzugt vom PS-I und weniger vom PS-II absorbiert wird. Diese selektive Tätigkeit des PS-I zieht Elektronen aus der Elektronentransportkette zurück und führt zu einem maximalen *photochemical quenching* im PS-II, diese minimalen Fluoreszenzwerte sind F_0 und F_0' (Pfündel, 2007).

Zusammengefasst können mehrere Schlussfolgerungen aus diesen Werten gezogen werden. Erstens der Fluoreszenzanstieg durch den Abfall des *photochemical quenching* von einem Maximalwert auf einen Minimalwert in Dunkelheit- und Lichtangepassten Bedingungen (F_M-F_0 & $F_M'-F_0'$). Zweitens der Fluoreszenzabfall durch photoaktives Licht-aktiviertes *nonphotochemical quenching* in Abwesenheit und bei maximalem *photochemical quenching* (F_M-F_M' & F_0-F_0') (Pfündel, 2007).

Für die folgenden Experimente wurden auf vier verschiedenen Höhenstufen PAM Messungen durchgeführt (1600m, 1800m, 2000m und 2200m). Es wurde jeweils 1 Blatt von zwei verschiedenen *Alchemilla vulgaris* Pflanzen und 1 Blatt von zwei *Arabidopsis thaliana* untersucht. Die *Alchemilla* waren an diesen Standorten heimisch, während die *Arabidopsis* Pflanzen in einem Gewächshaus aufgezogen wurden und zwei beziehungsweise drei Tage vor den Experimenten an den jeweiligen Standorten platziert wurden.

Material und Methoden

Alle Messungen des Versuches wurden in vier verschiedenen Höhenstufen durchgeführt: 1600 m, 1800 m, 2000 m und 2200 m. Für die Messungen wurde ein JUNIOR RAM Teaching Chlorophyll Fluorometer der Firma WALZ verwendet. Dieses Messgerät kann unter anderem dafür verwendet werden, die Effizienz des Fotosystems II bzw. die Höhe des sogenannten non-photochemical quenchings (s.o.) zu erhöhen.

Die vier Standpunkte liegen geographisch etwa in einer Linie, um eine größtmögliche Vergleichbarkeit zu erzielen.

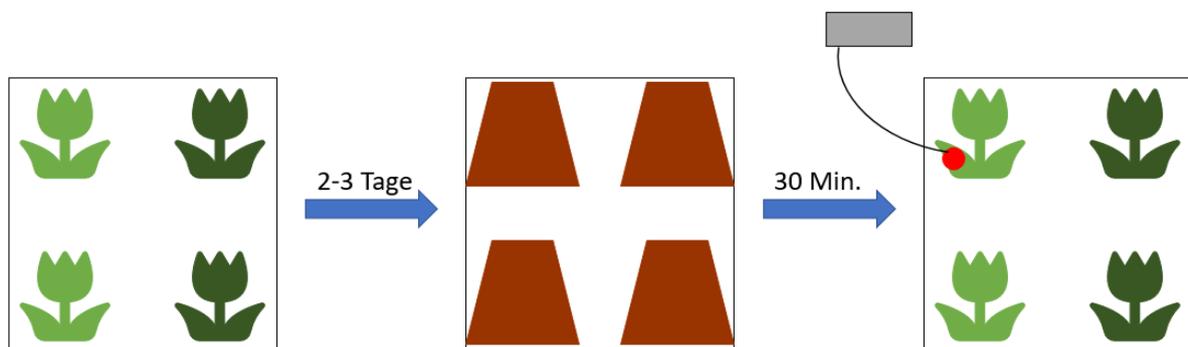


Abb. 3: Zeitliche Abfolge des Experiments. Hellgrün: *A. thaliana*. Dunkelgrün: *Alchemilla*.

Zunächst wurden zwei bzw. drei Tage vor der Messung im Labor angezogene *Arabidopsis thaliana* Pflanzen an den jeweiligen Standpunkten in direkter Nähe zu mehreren Pflanzen der Gattung *Alchemilla*, welche an den Standpunkten heimisch sind, abgestellt.

Für die Messung wurde dann pro Standort jeweils ein Blatt von zwei Pflanzen jeder Art mit dem Fluorometer gemessen.



Abb. 4: Messung am Blatt einer *Alchemilla* Pflanze.

Zuvor wurden alle vier Pflanzen für ca. 30 Minuten mit einer Abdeckung verdunkelt, sodass kein linearer Elektronentransport der Fotosynthese mehr stattfindet und das Fotosystem II zum Startpunkt der Messung weitestgehend stillliegt.

Bei der Messung wurde darauf geachtet, dass sich möglichst wenig Blattadern an der gemessenen Stelle befinden, da dies die Messung verfälschen könnte und weniger Vergleichbarkeit herrschen würde.

Ergebnisse

Äußeres Erscheinungsbild der Pflanzen

Bei den geringeren Höhe 1600 m und auch 1800 m zeigten die *Arabidopsis* Pflanzen äußerlich kaum eine Veränderung. Ab einer Höhe von 2000 m waren die Pflanzen deutlich verkümmerter und lagerten zuweilen auch sehr stark Schutzpigmente, wie beispielsweise Carotinoiden oder Xanthophylle, ein, was sich an einer violetten Färbung der Blattunterseite erkennen ließ. Carotinoide sind in der Lage, überschüssige Lichtenergie in Wärme umzuwandeln und so die Pflanze vor radikalen Sauerstoffspezies zu schützen, welche zu photooxidativen Schäden führen können.



Abb 5: Veränderung der eingeführten *A. thaliana* Pflanzen. Links: Einlagerung von Schutzpigmenten. Rechts: Verkümmern der Pflanze.

Bei der dort verbreiteten *Alchemilla* änderte sich lediglich die Behaarung der Pflanze: Mit steigender Höhe nahm auch die Behaarung der Blätter stark zu.



Abb. 6: Blattunterseite einer *Alchemilla*-Pflanze auf 2000 m Höhe.

Messung der Blätter

Tabelle 1: Zusammenfassung der Fo/Fm und NPQ Werte der PAM Messungen

Höhe [m]	Messung	<i>Alchemilla vulgaris</i>		<i>Arabidopsis thaliana</i>	
		Fo/Fm = Y(II)	NPQ	Fo/Fm = Y(II)	NPQ
1600	2	0,597		0,561	
	3	0,635		0,597	
	Mittelwert	0,616		0,579	
	sdv	0,019		0,018	
1800	1	0,493		0,622	-0.16
	2	0,641		0,573	
	Mittelwert	0,567		0,5975	
	sdv	0,074		0,0245	

2000	1	0,705		0,711	
	2	0,593		0,646	
	Mittelwert	0,649		0,6785	
	sdv	0,056		0,0325	
2200	1	0,742		0,629	
	2	0,585		0,558	1.16
	3	0,702			
	Mittelwert	0,676333333		0,5935	
	sdv	0,06661498		0,0355	

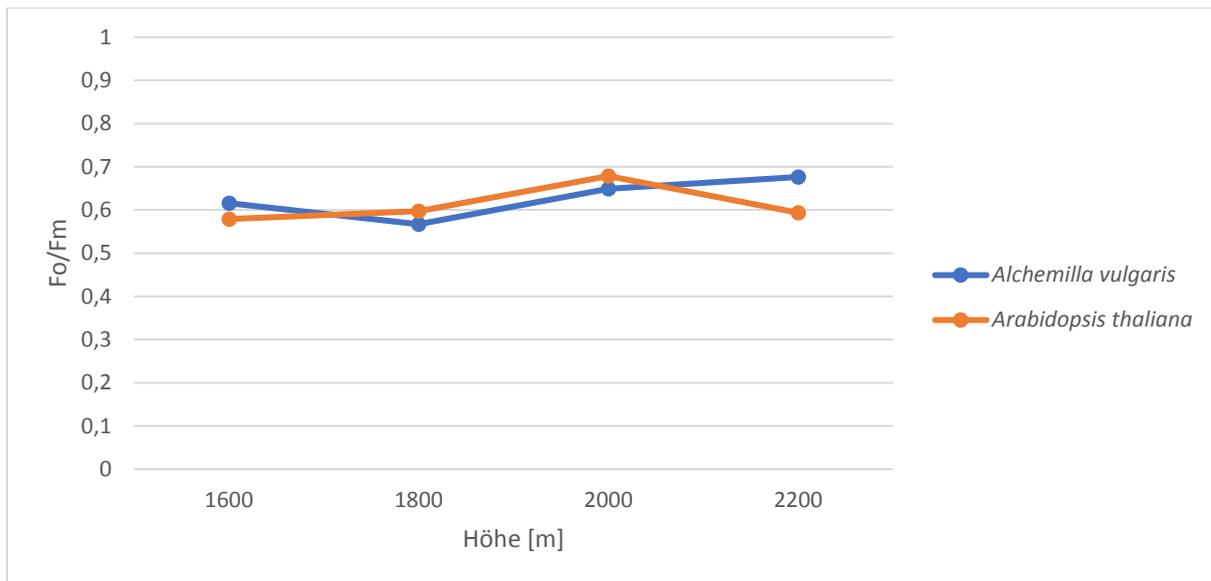


Abbildung 7: Mittelwerte der Fo/Fm-Werte für beide Pflanzenarten in verschiedenen Höhen (siehe auch Tabelle 1).

Während den Messungen wurden leider keine NPQ Werte von der Software gespeichert. Die Fo/Fm Werte geben Rückschluss auf die Effizienz des Photosystems. Mit Ausnahme der Werte bei *Arabidopsis thaliana* 2200 m und *Alchemilla vulgaris* 1800 m, ist bei beiden Pflanzen ein Trend zu zunehmenden Werten in größerer Höhe zu beobachten. Die Werte liegen bei beiden Arten zwischen circa 0,5 und 0,7. Die zusammengefassten Rohdaten zu allen Messungen von beiden Arten sind im Anhang aufgelistet.

Diskussion

Die Veränderung beider Pflanzenarten mit zunehmender Höhe zeigt, dass Pflanzen generell in dieser Höhe mit einer stärkeren Sonneneinstrahlung zu kämpfen haben und unterschiedliche Schutzmechanismen entwickeln müssen, um keine photooxidativen Schäden davonzutragen.

Während hingegen die heimischen Pflanzen, in diesem Fall repräsentiert von *Alchemilla*, schon an die dort herrschenden Bedingungen angepasst sind, sind die dort eingebrachten *Arabidopsis* Pflanzen der erhöhten Strahlung zunächst weniger geschützt ausgesetzt, was in höheren Lage dazu geführt hat, dass diese Pflanzen teilweise sehr klein und verkümmert wirkten.

In Folge dessen war es zunehmend schwieriger, bei der Messung das Messgerät so an das Blatt anzubringen, dass der Sensor komplett von der Blattseite bedeckt war und die Pflanze beim Anbringen des Gerätes nicht verletzt wurde oder das Anbringen zu lange dauerte, was in diesem Fall auch mögliche Fehlerquellen sein könnten.

Außerdem war zu beobachten, dass die Pflanzen in diesem Fall farbige Schutzpigmente in ihre Blätter einlagerten, um sich und ihre Photosysteme vor überschüssiger Sonnenstrahlung zu schützen.

Aufgrund geringer Kenntnis der Software zum Junior PAM wurde erst beim Auswerten festgestellt, dass keine Speicherung der NPQ Werte (außer für *Arabidopsis thaliana* 1800_1 und 2200_2) stattgefunden hatte. Eine Auswertung dieses Parameters ist daher nicht möglich. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die NPQ Werte mit der Höhe für *Alchemilla vulgaris* gleichbleibend sind, da diese Pflanzen gut adaptiert waren und dementsprechend trotz der Einstrahlung Elektronen ähnlich gut nutzen können. Bei *Arabidopsis thaliana* hätten die Werte vermutlich zugenommen, da die Pflanzen bei zunehmender Licht- und UV- Strahlungsintensität mehr Energie in Fluoreszenz umgewandelt und nicht im PS-II genutzt hätten.

Außerdem wurden die $Y(II)$ Werte betrachtet, welche mit dem F_o/F_m Werten gleichzusetzen sind und Rückschluss auf die Effizienz des Photosystems geben. Sofern man die Werte bei *Arabidopsis thaliana* 2200 m und *Alchemilla vulgaris* 1800 m als Ausreißer bewertet, ist bei beiden Pflanzen ein Trend zu zunehmenden Werten in größerer Höhe festzustellen. Desto größer $Y(II)$, umso höher ist der Quotient aus F_o und F_m . Die Differenz aus F_m und F_o ist dementsprechend hoch und der Großteil des eingestrahlten Lichts wird in Fluoreszenz umgewandelt. Sowohl die adaptierte als auch die nicht angepasste Pflanzenart weisen demnach eine geringere Effizienz mit höherer Einstrahlung in größerer Höhe auf.

Literatur

Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R. (2015). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Zweite Auflage. John Wiley & Sons, Ltd

Taiz, L. & Zeiger, E. (2000). Physiologie der Pflanzen. Spektrum Akademischer Verlag GmbH

Schopfer, P. & Brennicke, A. (2010). Pflanzenphysiologie. Siebte Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH

Pfündel, E. (2007). Junior PAM Chlorophyll fluorometer, Operator's Guide. Erste Auflage. Heinz Walz GmbH

http://plantphys.info/plant_physiology/light.shtml (12.08.2017)

<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/carotinoide/2137%E2%80%9E%20target=>
(08.09.2017)

<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/xanthophylle/12954> (08.09.2017)

Rohdaten und Mittelwerte *Alchemilla vulgaris* zum ersten gemessenen Zeitpunkt

Höhe [m]		Ft	PAR*	Temp*	F	Fm'	PAR	Temp	Y(II)	ETR	Fo'
1600	2	355	0	34,4	374	929	0	34,8	0,597	0	-
	3	17	0	34,8	232	636	0	34,4	0,635	0	-
	Mittelwert	186	0	34,6	303	782,5	0	34,6	0,616	0	-
	sdv	169	0	0,2	71	146,5	0	0,2	0,019	0	-
1800	1	332	-	-	332	655	0	34,4	0,493	0	-
	2	244	-	-	280	719	0	32,9	0,641	0	11
	Mittelwert	244	-	-	306	687	0	33,65	0,567	0	11
	sdv	0	-	-	26	32	0	0,75	0,074	0	0
2000	1	200	-	-	200	678	0	24,1	0,705	0	-
	2	273	-	-	266	654	0	26,5	0,593	0	-
	Mittelwert	273	-	-	233	666	0	25,3	0,649	0	-
	sdv	0	-	-	33	12	0	1,2	0,056	0	-
2200	1	168	-	-	163	633	0	39,2	0,742	0	-
	2	214	-	-	230	554	0	35,1	0,585	0	-
	3	167	-	-	159	534	0	35,8	0,702	0	-
	Mittelwert	183	-	-	184	573,6666667	0	36,7	0,676333333	0	-
	sdv	21,92411154	-	-	32,56787783	42,74212078	0	1,790716802	0,06661498	0	-

Rohdaten und Mittelwerte *Arabidopsis thaliana* zum ersten gemessenen Zeitpunkt

Höhe [m]		Ft	PAR*	Temp*	F	Fm'	PAR	Temp	Y(II)	ETR	Fo'	qP	qN	qL	NPQ	Y (NO)	Y (NPQ)
1600	1	269	0	33,1	283	645	0	33,1	0,561	0	-	-	-	-	-	-	-
	2	355	0	34,4	274	929	0	34,8	0,597	0	-	-	-	-	-	-	-
	Mittelwert	312	0	33,75	278,5	787	0	33,95	0,579	0	-	-	-	-	-	-	-
	sdv	43	0	0,65	4,5	142	0	0,85	0,018	0	-	-	-	-	-	-	-
1800	1	424	-	-	359	942,5	126	31,8	0,622	35,6	13	0,685	-0,894	0,037	-0,162	1,113	-0,786
	2	448	-	-	434	1016	0	30,8	0,573	0	-	-	-	-	-	-	-
	Mittelwert	436	-	-	396,5	979,25	0	31,3	0,5975	17,8	-	-	-	-	-	-	-
	sdv	12	-	-	37,5	36,75	0	0,5	0,0245	17,8	-	-	-	-	-	-	-
2000	1	172	-	-	176	608	0	30,8	0,711	0	-	-	-	-	-	-	-
	2	297	-	-	249	703	0	33,2	0,646	0	-	-	-	-	-	-	-
	Mittelwert	234,5	-	-	212,5	655,5	0	32	0,6785	0	-	-	-	-	-	-	-
	sdv	62,5	-	-	36,5	47,5	0	1,2	0,0325	0	-	-	-	-	-	-	-
2200	1	191	-	-	168	453	0	36,5	0,629	0	-	-	-	-	-	-	-
	2	308	-	-	175	448	126	35,8	0,558	24,2	1,043	0,677	1,08	1,157	0,25	0,293	
	Mittelwert	249,5	-	-	171,5	450,5	63	36,15	0,5935	12,1	-	-	-	-	-	-	-
	sdv	58,5	-	-	3,5	2,5	63	0,35	0,0355	12,1	-	-	-	-	-	-	-