

Diss. ETH Nr. 7918

VERGLEICH DES GASAUSTAUSCHES MIT DER ENZYMKINETIK BEI DER
PHOTOSYNTHESE UND DER PHOTORESPIRATION VON WEISSKLEE
(*TRIFOLIUM REPENS L.*)

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der technischen Wissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von
BERCHTOLD LEHNHERR
Dipl. Ing. Agr. ETH
geboren am 18. Januar 1950
von Spiez (BE)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. J. Nösberger, Referent
Prof. Dr. Ph. Matile, Korreferent

1985

Kapitel V

ZUSAMMENFASSUNG

Die Eigenschaften des Gasaustausches intakter Weisskleeblätter wurden mit der Enzymkinetik von Ribulosebisdiphosphat-Carboxylase-Oxygenase (RuBPCO) verglichen, um Näheres über das Verhältnis der Substratkonzentrationen von CO_2 und O_2 im Chloroplasten aussagen zu können. Dieses Substratverhältnis am Enzym bestimmt nämlich das Verhältnis der Carboxylierung zur Oxygenierung und damit auch dasjenige der Photosynthese zur Photorespiration.

Die kinetischen Eigenschaften der aus jungen Weisskleeblättern extrahierten RuBPCO wurden sowohl in kombinierten wie getrennten Tests bestimmt. Dabei zeigte sich, dass dessen CO_2/O_2 -Spezifität ($V_c/K_c \cdot K_o/V_o = v_c/v_o \cdot O/C$) praktisch temperaturunabhängig war: Die Aktivierungsenergie der CO_2/O_2 Spezifität *in vitro* betrug zwischen 10°C und 25°C nur $5,8 \text{ kJ mol}^{-1}$, währenddem sie für die maximale Carboxylierungsrate (V_c) $85,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ und für die maximale Oxygenierungsrate (V_o) $39,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ aufwies.

Der Gasaustausch gleichaltriger, vollentwickelter Weisskleeblätter wurde einerseits durch die Nettphotosynthese mittels Infrarotgasmessungen und andererseits durch die Bruttphotosynthese mittels Kurzeitaufnahmen von $^{14}\text{CO}_2$ bestimmt. Das Verhältnis der Photosynthese zur Photorespiration konnte nun bei verschiedenen Temperaturen und CO_2 -Konzentrationen dem Verhältnis der Carboxylierung zur Oxygenierung gegenübergestellt werden. Bei 25°C und $30 \text{ Pa p}(\text{CO}_2)$ stimmten diese Verhältnisse überein. Das Verhältnis der Photosynthese zur Photorespiration stieg jedoch mit abnehmender Temperatur an und stand damit im Widerspruch zum Verhältnis der Carboxylierung zur Oxygenierung der *in vitro* geprüften RuBPCO, welches praktisch temperaturunabhängig war. Die durch die CO_2/O_2 -Spezifität *in vitro* charakterisierte Kinetik von RuBPCO deckte sich also bei tiefen Temperaturen nicht mehr mit der CO_2/O_2 -Spezifität des Gasaustausches *in vivo*. Bei $30 \text{ Pa p}(\text{CO}_2)$ in der Umgebungsluft betrug die CO_2/O_2 -Spezifität *in vivo* bei 10°C 123, bei 20°C 98 und bei 30°C 69, währenddem sie *in vitro* in diesem Tempe-

raturbereich bei 78 lag. Die Diskrepanz zwischen der RuBPCO-Kinetik und dem Gasaustausch vergrößerte sich mit abnehmendem CO_2 -Partialdruck, und umgekehrt verkleinerte sie sich mit zunehmendem CO_2 -Partialdruck in der Umgebungsluft.

Der Vergleich zwischen Enzymkinetik und Gasaustausch beruht auf der begründeten Annahme, dass das Verhältnis der Carboxylierung zur Oxygenierung der RuBPCO nicht veränderbar und deshalb *in vitro* wie *in vivo* gleich sei. Die festgestellte Diskrepanz zwischen der CO_2/O_2 -Spezifität *in vitro* und *in vivo* gründet folglich auf einer Unterschätzung der CO_2 -Konzentration im Chloroplasten. Anhand eines Photosynthesemodells (Mächler et al., 1985) konnte aus der Unstimmigkeit zwischen der Kinetik der RuBPCO *in vitro* und dem Gasaustausch *in vivo* gezeigt werden, dass ein CO_2 -Konzentrierungsmechanismus bei tiefen Temperaturen und geringem CO_2 -Partialdruck eine erhöhte CO_2 -Konzentration in den Chloroplasten bewirkt.

Bei Algen erhöht ein Absenken der CO_2 -Konzentration die Effizienz des postulierten CO_2 -Konzentrationsmechanismus. Auch die Weisskleeblätter nach Anzucht bei geringem CO_2 -Partialdruck (20 Pa) wiesen eine höhere CO_2/O_2 -Spezifität des Gaswechsels *in vivo* auf als die Blätter nach Anzucht bei 100 Pa $p(\text{CO}_2)$. Offenbar verfügen Weisskleeblätter über einen ähnlichen CO_2 -Konzentrierungsmechanismus, wie er bei Algen und Wasserpflanzen festgestellt worden ist.

Kapitel VI

SUMMARY

The properties of gas exchange of intact white clover leaves were compared with the kinetics of Ribulosebiphosphate Carboxylase Oxygenase (RuBPCO) in order to obtain information about the concentration of the substrates of CO₂ and O₂ in the chloroplasts. This ratio of the substrates at the enzyme site determines the ratio of carboxylation to oxygenation and consequently the ratio of photosynthesis to photorespiration.

The kinetics of RuBPCO, extracted from young white clover leaves, were determined in combined and separate assays. Its substrate specificity factor ($V_c/K_o \cdot K_o/V_o = v_c/v_o \cdot O/C$) was virtually unaffected by temperature. Between 10°C and 25°C, the energy of activation for the specificity factor *in vitro* was 5.8 kJ mol⁻¹; whereas it was 85.6 kJ mol⁻¹ for the maximum rate of carboxylation (V_c) and 39.1 kJ mol⁻¹ for the maximum rate of oxygenation (V_o).

The gas exchange of fully expanded white clover leaves of the same age was characterized by the net uptake of CO₂ measured by infrared gas analysis as well as by gross uptake measured by short time exposure to ¹⁴CO₂. The ratio of photosynthesis to photorespiration *in vivo* was compared with the ratio of carboxylation to oxygenation *in vitro* at different temperatures and CO₂ concentrations. These ratios were in agreement at 25°C and at 30 Pa p(CO₂) but they differed at low temperatures at which the ratio of photosynthesis to photorespiration exceeded the ratio of carboxylation to oxygenation. At low temperatures, the results showed discrepancies between the kinetics of RuBPCO as characterized by the specificity factor *in vitro* and gas exchange in intact leaves which was characterized by the specificity factor *in vivo*. These specificity factors *in vivo* were 123, 98 and 69 at 10°C, 20°C and 30°C, respectively. The specificity factor *in vitro* was about 78 for the latter mentioned range of temperature. The discrepancies between the kinetics of RuBPCO and the gas exchange increased when CO₂ partial pressure was

decreased. On the other hand, a decrease was found when the CO₂ partial pressure of ambient air was increased.

This comparison between enzyme kinetics and gas exchange is based on the fact that the ratio of carboxylation to oxygenation of RuBPCO can not be changed and is the same *in vitro* as *in vivo*. Consequently, the measured discrepancy between the specificity factors *in vitro* and *in vivo* was due to an underestimation of the CO₂ concentration in the chloroplasts. By means of a model of photosynthesis (Mächler et al., 1985), the discrepancies between kinetics of RuBPCO and gas exchange were verified as being due to a CO₂ concentrating mechanism which raised the CO₂ concentration in the chloroplasts at low temperature and low CO₂ partial pressure.

In algae, a decrease in CO₂ concentration raises the efficiency of the postulated CO₂ concentrating mechanism. Similarly, leaves of white clover plants grown at low CO₂ partial pressure (20 Pa) showed a higher specificity factor *in vivo* than leaves grown at 100 Pa p(CO₂). Obviously, a CO₂ concentrating mechanism similar to that which has been found in aquatic plants must have affected the CO₂ concentration in white clover leaves at low temperatures.