

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

## INHALT

<i>Kapitel</i>	<i>Seite</i>
I. EINLEITUNG . . . . .	1
Das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase . . . . .	2
Die Temperaturabhängigkeit des Gasaustausches und der Enzymkinetik . . . . .	4
Die CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> -Spezifität . . . . .	6
Der CO <sub>2</sub> -Konzentrierungsmechanismus . . . . .	8
II. MATERIAL UND METHODEN . . . . .	11
Die Versuchspflanzen . . . . .	11
Das Enzym (Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Oxygenase) . . . . .	12
Die Extraktion und Aktivierung . . . . .	12
Der getrennte Carboxylase- und Oxygenasetest . . . . .	12
Der kombinierte Aktivitätstest . . . . .	13
Die Enzymberechnungen . . . . .	14
Die Gasaustauschmessungen . . . . .	14
Die Nettophotosynthese . . . . .	14
Die Bruttophotosynthese . . . . .	16
Die Gasaustauschberechnungen . . . . .	17
Die Datenverarbeitung . . . . .	20
III. RESULTATE UND DISKUSSION . . . . .	21
Die Eigenschaften der gereinigten Ribulosebisphosphat- Carboxylase-Oxygenase . . . . .	21
Die Eigenschaften des Gasaustausches im Vergleich mit den Enzymeigenschaften . . . . .	28

Der Lichteinfluss auf das Verhältnis der Photosynthese zur Photorespiration . . . . .	28
Der Einfluss der Temperatur und der CO <sub>2</sub> -Konzentration auf das Photosynthese/Photorespirationsverhältnis . . . .	30
Der Einfluss der CO <sub>2</sub> -Konzentration während der Anzucht auf das Photosynthese-Photorespirationsverhältnis . . . .	36
Der Einfluss der CO <sub>2</sub> -Konzentration während der Anzucht auf die Nettophotosynthese . . . . .	42
IV. SCHLUSSDISKUSSION . . . . .	46
V. ZUSAMMENFASSUNG . . . . .	52
VI. SUMMARY . . . . .	54
VII. LITERATUR . . . . .	56
Anhang . . . . .	60
A. VERDANKUNGEN . . . . .	60
B. LEBENSLAUF . . . . .	61

## Kapitel I

### EINLEITUNG

Bei der Photosynthese wird Lichtenergie zum Aufbau von Kohlenhydraten verwendet. Dabei wird  $\text{CO}_2$  enzymatisch auf Ribulosebisphosphat übertragen, welches dadurch carboxyliert wird. Das daran beteiligte Enzym, die Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (RuBPCO), vermag aber auch unter Anwesenheit von  $\text{O}_2$  Ribulosebisphosphat zu oxygenieren, wodurch die Reaktionsfolge der Photorespiration eingeleitet wird, bei der  $\text{CO}_2$  - jedoch ohne Energiegewinn - freigesetzt wird (Figur 1). Die Nettphotosynthese der  $\text{C}_3$ -Pflanzen kann durch die Photorespiration besonders bei höheren Temperaturen erheblich vermindert werden.

Vom agronomischen Gesichtspunkt aus würden  $\text{C}_3$ -Kulturpflanzen ohne Photorespiration eine Ertragserhöhung in Aussicht stellen. Die Eliminierung der Photorespiration gelang aber bis heute nicht. Jordan und Ogren (1983) zeigten, dass sich das Verhältnis von Carboxylierung zu Oxygenierung im Laufe der Evolution der Pflanzen zugunsten der Carboxylaseaktivität verschoben hatte. Es besteht die Frage, ob die Carboxylasefunktion der RuBPCO einer Zuchtsorte erhöht und die Oxygenaseaktivität verkleinert werden könnten, um eine grössere Nettphotosyntheserate zu erreichen. Aber die kinetischen Eigenschaften der RuBPCO haben sich bisher weder durch Mutation noch durch chemische Modifikation grundlegend beeinflussen lassen.

Das Verhältnis von Photosynthese zu Photorespiration wird im wesentlichen durch das Verhältnis der Konzentrationen der Substrate  $\text{CO}_2$  zu  $\text{O}_2$  im Chloroplasten bestimmt. Eine Erhöhung des Verhältnisses von Photosynthese zu Photorespiration könnte somit durch eine Erhöhung des Konzentrationsverhältnisses von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{O}_2$  erreicht werden. Diese Substratkonzentrationen lassen sich im Stroma nicht direkt messen, ohne das Blatt zu zerstören und die Chloroplasten zu berühren. Deshalb ist eine indirekte Messmethode angezeigt. Sie wird in dieser Arbeit beschrieben: Einerseits werden die Photosynthese- und Photorespirationsraten an unversehrten Weisskleeblättern gemessen und

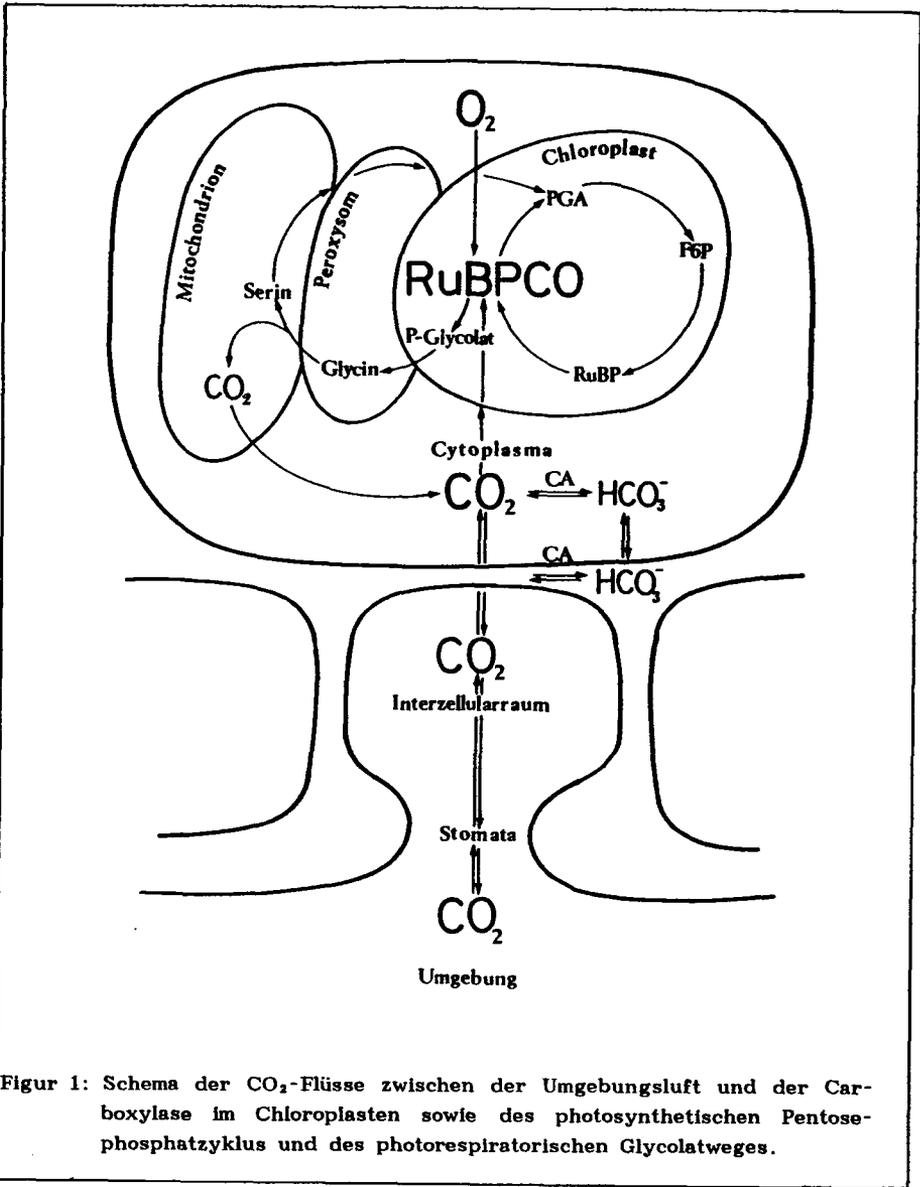
andererseits die Carboxylierungs- und Oxygenierungsraten des extrahierten Enzyms, der RuBPCO, im Reagenzglas bestimmt. Aus dem Vergleich dieser beiden Messungen lässt sich indirekt auf das Konzentrationsverhältnis von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{O}_2$  im Blatt schliessen. Eine Erhöhung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration am Fixierungsort wird bei Algen durch das Hineinpumpen von Bicarbonat erreicht. Bei den  $\text{C}_4$ -Pflanzen wird dagegen Malat als  $\text{CO}_2$ -Transportform benützt, das in den Chloroplasten der Scheidenzellen eine erhöhte  $\text{CO}_2$ -Konzentration bewirkt. In diesen Chloroplasten, wo sich auch die RuBPCO befindet, herrscht gleichzeitig eine verminderte  $\text{O}_2$ -Konzentration, weil der aus der Photolyse des Wassers stammende Sauerstoff ausserhalb, nämlich in den Chloroplasten der Mesophyllzellen freigesetzt wird, und damit die Oxygenase der RuBPCO praktisch ohne Substrat bleibt. Deshalb weisen  $\text{C}_4$ -Pflanzen - wie auch Algen - keine wesentliche Photorespiration auf, die aufgrund der *in vitro* geprüften Enzymkinetik ihrer RuBPCO viel bedeutender sein müsste.

Als Beispiel für höhere  $\text{C}_3$ -Pflanzen wird hier die Diskrepanz des Gasaustausches *in vivo* bei Weisskleeblättern zur Enzymkinetik ihrer RuBPCO *in vitro* untersucht. Aufgrund der Unstimmigkeit wird auf die Wirksamkeit eines  $\text{CO}_2$  Konzentrierungsmechanismus im Blatt geschlossen. Dieser tritt dann in Erscheinung, wenn das Verhältnis der Photosynthese zur Photorespiration grösser ist als dasjenige der Carboxylase- zur Oxygenaseaktivität.

## 1.1 DAS ENZYM RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHAT-CARBOXYLASE-OXYGENASE

Dieses Enzym katalysiert sowohl die Fixierung von  $\text{CO}_2$  in der Photosynthese, als auch die Aufnahme von  $\text{O}_2$  in der Photorespiration. Dadurch hängen die Aktivitäten der Carboxylase und der Oxygenase eng mit dem Gasaustausch intakter Blätter zusammen. Beim Experimentieren mit dem extrahierten Enzym im Reagenzglas können die Konzentrationen der Substrate  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  genau kontrolliert werden. Dagegen sind die Gaskonzentrationen in den Chloroplasten intakter Blätter an der Stelle, wo sich die RuBPCO *in vivo* befindet, nicht genau bekannt und ohne Zerstörung des Systems heute noch nicht direkt bestimmbar.

Auf dem Weg von der Aussenluft in die Chloroplasten muss das Substrat  $\text{CO}_2$  eine Reihe von Widerständen überwinden (Figur 1). Das  $\text{CO}_2$  gelangt



Figur 1: Schema der  $\text{CO}_2$ -Flüsse zwischen der Umgebungsluft und der Carboxylase im Chloroplasten sowie des photosynthetischen Pentosephosphatzyklus und des photorespiratorischen Glycolatweges.

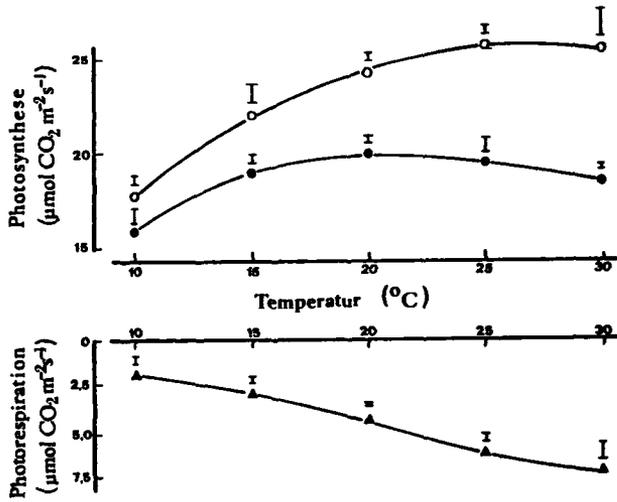
durch die Spaltöffnungen in den Interzellularraum. Mit dem Uebertritt in die Zellwände wechselt es aus der Gas- in die Flüssigphase über, wobei seine Fortbewegung verzögert wird.  $\text{CO}_2$  löst sich in Wasser und bildet, katalysiert durch die Carboanhydrase (CA),  $\text{HCO}_3^-$ , das in der Flüssigphase das  $\text{CO}_2$  begleitet, und dessen Anteil vom pH-Wert abhängig ist. Der anorganische Kohlenstoff gelangt durch das Plasmalemma in die Zelle und durch die Chloroplastenhülle ins Stroma zur RuBPCO. Gleichzeitig wird das Blatt auch vom Sauerstoff umspült, der leichter als  $\text{CO}_2$  in die Organellen und zur RuBPCO vordringt. Im Falle der Carboxylierung entstehen aus Ribulosebisphosphat (RuBP) und  $\text{CO}_2$  zwei Moleküle Phosphoglycerat (PGA), die im Calvinzyklus weiter verarbeitet werden. Im Falle der Oxygenierung von RuBP entstehen je ein Molekül Phosphoglycerat und Phosphoglycolat, wobei letzteres im Photorespirationszyklus decarboxyliert wird. Das photorespirierte  $\text{CO}_2$  wird refixiert oder entweicht wieder aus dem Blatt.

## 1.2 DIE TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DES GASAUSTAUSCHES UND DER ENZYMKINETIK

Bisherige Vergleiche zwischen der RuBPCO-Kinetik und dem Gasaustausch beschäftigten sich namentlich mit der Temperaturabhängigkeit. Die Photorespiration und die Photosynthese werden von der Temperatur in ungleichem Masse beeinflusst, wie auch unsere Messungen der  $^{14}\text{CO}_2$ - $^{12}\text{CO}_2$  Aufnahme zeigen (Figur 2). Von  $10^\circ\text{C}$  bis  $20^\circ\text{C}$  nahm die Photorespiration um mehr als das Doppelte zu, während sich die Bruttphotosynthese um den Faktor 1,4 erhöhte.

Es stellt sich die Frage, ob dieser Unterschied durch die Enzymkinetik der RuBPCO bedingt sei oder auf der Verfügbarkeit der Substrate  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  im Blatt beruhe. Einerseits beeinflusst die Temperatur die maximalen Carboxylase- und Oxygenaseraten unterschiedlich (Laing, Ogren und Hagemann, 1974; Badger und Collatz, 1977); andererseits ist die Löslichkeit von  $\text{O}_2$  und  $\text{CO}_2$  ungleich temperaturabhängig (Ku und Edwards, 1977a).

Bezüglich der Temperaturabhängigkeit der Enzymkinetik bestehen widersprüchliche Angaben in der Literatur. Es ist unklar, inwieweit der Temperatureinfluss auf die Photosynthese und Photorespiration der RuBPCO-Kinetik zugeschrieben werden kann (Hall und Keys, 1983, Jordan und Ogren, 1984). Die Bestimmung der kinetischen Eigenschaften der RuBPCO ist auch



Figur 2: <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-Gasaustauschmessungen an Weisskleeblättern dienten zur Berechnung der Netto- (●) und Bruttophotosynthese (O) sowie der Photorespiration (▲) in Abhängigkeit der Temperatur. Die Raten wurden bei 2000 μmol Quanten m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> gemessen. Die senkrechten Balken stellen die mittleren Fehler von 4 bis 8 Bestimmungen dar.

schwierig. Zwar wurden die Methoden in den Jahren 1970-1980 verbessert. So fanden Lorimer, Badger und Andrews (1977), dass zur Enzymaktivierung CO<sub>2</sub> und Mg<sup>2+</sup> vorhanden sein müssen, und Jordan und Ogren (1981) verringerten den Versuchsfehler, indem sie beide Reaktionsgeschwindigkeiten gleichzeitig und im gleichen Gefäß (Sauerstoffelektrode) bestimmten.

### 1.3 DIE CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-SPEZIFITÄT

Der Vergleich des Verhältnisses der Carboxylase zur Oxygenase mit dem Verhältnis der Photosynthese zur Photorespiration kann anhand der CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität vollzogen werden. Die CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität wurde von Jordan und Ogren (1981) als 'substrate specificity factor' bezeichnet. Diese Grösse entspricht *in vitro* dem Verhältnis der Carboxylase- zur Oxygenaserate bei bestimmtem Verhältnis der O<sub>2</sub>- zur CO<sub>2</sub>-Konzentration. Zugleich kann sie aus den kinetischen Konstanten der RuBPCO abgeleitet werden (Laing et al. 1974):

$$S \text{ in vitro} = v_c / v_o \cdot O / C = V_c \cdot K_o / V_o \cdot K_c \quad (1);$$

wobei  $v_c$  und  $v_o$  die Carboxylierungs- und Oxygenierungsraten sind und O und C die Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentrationen.  $V_c$  und  $V_o$  entsprechen den Maximalraten der Carboxylierung und Oxygenierung,  $K_c$  und  $K_o$  den Michaeliskonstanten für CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>.

In analoger Weise kann die CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität auch *in vivo* bestimmt werden. Bei der CO<sub>2</sub>-Kompensationskonzentration ( $\Gamma$ ) ist die photosynthetische CO<sub>2</sub>-Aufnahme gleich der respiratorischen CO<sub>2</sub>-Abgabe. Nach Laing et al. (1974) entspricht:

$$S \text{ in vivo} = 1/2 \cdot O / \Gamma \quad (2);$$

wobei der Faktor 1/2 für das Verhältnis des photorespirierten CO<sub>2</sub> zum O<sub>2</sub> steht, das durch die Oxygenase fixiert wird.

Mit dieser Gleichung verglichen Ku und Edwards (1977b) den Gasaustausch der Blätter direkt mit der Enzymkinetik, wobei sie allerdings die 'Dunkelrespiration' im Licht nicht berücksichtigten. Zudem erfolgte die Gegenüberstellung nicht bei normalem CO<sub>2</sub>-Partialdruck von 33 Pa  $p(\text{CO}_2)$ , sondern bei niedrigen CO<sub>2</sub>-Kompensationskonzentrationen.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die RuBPCO-Kinetik mit dem Gaswechsel verglichen. Dabei wurde Photosynthese und Photorespiration aus der unterschiedlichen Aufnahme von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> und <sup>12</sup>CO<sub>2</sub> ermittelt und die CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität *in vivo* nach der Gleichung (3) bestimmt, um ihn der CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität *in vitro* gegenüber zu stellen.

$$S \text{ in vivo} = P' / 2(P'-F) \cdot O / C_1 \quad (3);$$

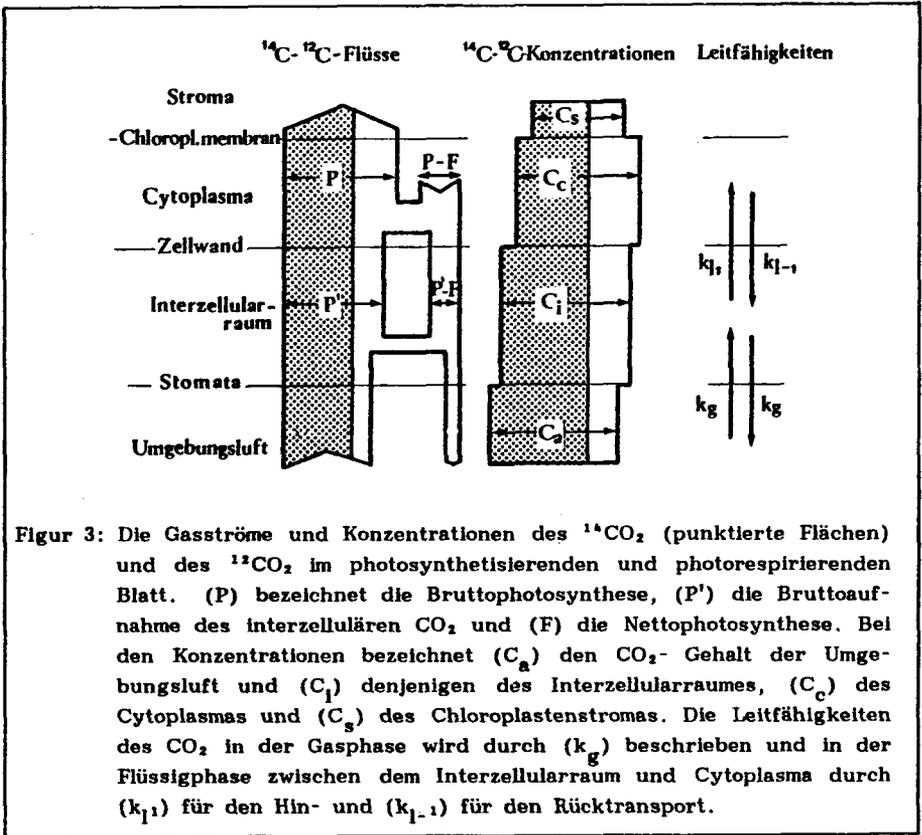
wobei  $P'$  der Bruttophotosynthese,  $F$  der Nettophotosynthese und  $C_1$  der interzellulären  $CO_2$ -Konzentration entsprach. In Bezug auf Gleichung (1) entspricht  $P'$  der Carboxylierungsrate ( $v_C$ ) und  $2(P'-F)$  der Oxygenierungsrate ( $v_O$ ). Mit der Gleichung (3) kann zwar die Dunkelrespiration auch nicht von der Photorespiration getrennt werden, aber die  $CO_2/O_2$ -Spezifität kann bei variablen  $CO_2$ - und  $O_2$ -Konzentrationen bestimmt werden.

Im Unterschied zur Bestimmung der  $CO_2/O_2$ -Spezifität *in vivo* durch die  $CO_2$ -Kompensationskonzentration in der Gleichung (2), hat die Anwendung der  $^{14}CO_2$ - $^{12}CO_2$ -Methode den Nachteil, dass die Bruttophotosynthese infolge der Reflexierung von photorespiriertem  $^{12}CO_2$  unterschätzt wird, und dass die  $CO_2$ -Konzentration im Stroma nicht direkt bekannt ist. Diese Probleme sind teilweise berücksichtigt worden, indem die Bruttoaufnahme von interzellulärem  $CO_2$  und die  $CO_2$ -Konzentration der Interzellularen in der Gleichung (3) eingesetzt worden sind. Die Bruttoaufnahme des  $CO_2$  aus dem Stroma des Chloroplasten und die dort herrschende  $CO_2$ -Konzentration können aber von diesen Bestimmungen abweichen, je nach den Leitfähigkeiten für  $CO_2$  zwischen Interzellularraum und Chloroplastenstroma.

Das Modell von Mächler, Lehnerr, Schnyder und Nösberger (1985) berücksichtigt die durch Diffusionswiderstände bedingte Abnahme der  $CO_2$ -Konzentration im Blatt und die Reflexierung von photorespiriertem  $CO_2$ . Es berücksichtigt auch, dass  $CO_2$  möglicherweise aktiv durch Membranen des Cytoplasmas oder der Chloroplasten aufgenommen werden kann. Dabei geht das Modell von den Flüssen, Konzentrationen und Leitfähigkeiten des  $^{14}CO_2$  und  $^{12}CO_2$  aus und setzt die  $CO_2/O_2$ -Spezifitäten *in vivo* denjenigen *in vitro* gegenüber:

$$S \text{ in vivo} = P' / 2(P'-F) \cdot O / C_1 = S \text{ in vitro} \cdot f \cdot k_{11} / k_{1-1} \quad (4);$$

wobei  $f$  dem Verhältnis der  $CO_2$ -Konzentration im Chloroplastenstroma zu derjenigen im Cytoplasma entspricht, und  $k_{11}$  und  $k_{1-1}$  die Leitfähigkeiten für  $CO_2$  zwischen Interzellularraum und Cytoplasma bei der Hin- respektive Rückbewegung sind (Figur 3). Die aktive  $CO_2$ -Aufnahme äussert sich in diesem Modell darin, dass der Faktor  $f \cdot k_{11} / k_{1-1}$  grösser als 1 wird.



Figur 3: Die Gasströme und Konzentrationen des  $^{14}\text{CO}_2$  (punktierte Flächen) und des  $^{12}\text{CO}_2$  im photosynthetisierenden und photorespirierenden Blatt. (P) bezeichnet die Bruttphotosynthese, (P') die Bruttoaufnahme des interzellulären  $\text{CO}_2$  und (F) die Nettphotosynthese. Bei den Konzentrationen bezeichnet ( $C_a$ ) den  $\text{CO}_2$ -Gehalt der Umgebungsluft und ( $C_i$ ) denjenigen des Interzellularraumes, ( $C_c$ ) des Cytoplasmas und ( $C_s$ ) des Chloroplastenstromas. Die Leitfähigkeiten des  $\text{CO}_2$  in der Gasphase wird durch ( $k_g$ ) beschrieben und in der Flüssigphase zwischen dem Interzellularraum und Cytoplasma durch ( $k_l$ ) für den Hin- und ( $k_{l-1}$ ) für den Rücktransport.

#### 1.4 DER $\text{CO}_2$ -KONZENTRIERUNGSMECHANISMUS

Viele Algenarten zeigen die Charakteristiken der  $\text{C}_4$ -Pflanzen: tiefe photosynthetische Kompensationspunkte, geringe Photorespiration. Algen wie Chara und Wasserpflanzen wie Elodea, sind fähig, anorganischen Kohlenstoff anzuhäufen. Durch diesen Mechanismus wird gleichzeitig der Einfluss der Photorespiration begrenzt. So erweist sich der  $\text{CO}_2$  Konzentrierungsmechanismus als eine Möglichkeit, die Hemmung der Photosynthese durch Sauerstoff zu verkleinern. Dieselbe Strategie wenden auch  $\text{C}_4$ -Pflanzen an, indem sie die  $\text{CO}_2$ -Konzentration in den Leitbündelscheidenzellen durch die Zuführung von Malat als  $\text{CO}_2$ -Träger erhöhen. Im Gegensatz zu dieser organischen Kohlenstoffverbindung nehmen  $\text{C}_3$ -Wasserpflanzen und Algen anorganisches Bicarbonat als  $\text{CO}_2$ -Carrier auf. Es drängt sich hier die Frage auf, ob eine aktive

Bicarbonat-Aufnahme als ein der Fixierung vorgelagerter Prozess auch bei  $C_4$ - und CAM-Pflanzen erfolgen könnte. Dies ist besonders interessant, weil  $HCO_3^-$  das eigentliche Substrat bei der Carboxylierung durch die Phosphoenolpyruvat Carboxylase darstellt. Eine umfassende Antwort darauf kann hier nicht gegeben werden. Weitere Untersuchungen des vermuteten  $CO_2$  Konzentrierungsmechanismus in höheren  $C_3$ -Pflanzen müssten auch die Carboanhydrase einbeziehen. Sie ist verantwortlich für die rasche Einstellung des Gleichgewichts zwischen  $CO_2$  und  $HCO_3^-$  und somit für die Freisetzung von  $CO_2$ , das durch die RuBPCO in den Calvinzyklus eingespielen werden kann. Diese Zulleferung erfolgt im Stroma der Chloroplasten. Sie wäre unkatalysiert zu langsam und ineffektiv, weil bei einem pH-Wert von 8 das Gleichgewicht auf Seiten des Bicarbonats liegt. Bei Adaptationsversuchen von Algen an niedrige  $HCO_3^-$  - Konzentrationen wurde denn auch eine erhöhte Carboanhydrase-Aktivität beobachtet (Hogetsu und Miyachi, 1979). Damit scheint dieses Enzym eine Schlüsselrolle bei der Zuführung von anorganischem Kohlenstoff zu spielen. Bicarbonat selber erhöhterweise durch eine Protonenpumpe aktiv aufgenommen. Bei erhöhtem pH-Wert des Mediums oder beim Ausgleich der durch die Bicarbonataufnahme veränderten elektrischen Membranpotentiale, muss vermutlich ein Ionenaustausch unter Energieaufwand betrieben werden. Wie die im Detail beteiligten Prozesse aussehen, ist umstritten und es bestehen erst Hypothesen, inwiefern die als  $HCO_3^-$  -Assimilatoren bezeichneten Arten über die nötigen photosynthetischen Puffer verfügen. Auch ist noch wenig über die biochemischen Mechanismen zum Ausgleich der elektrischen Potentiale und pH-Gradienten bekannt (Lucas, 1983). Einige Algen und  $C_3$ -Wasserpflanzen bewerkstelligen einen  $HCO_3^-$  -Transport auf Grund einer durch ATP-betriebenen Protonenpumpe. So ist der  $CO_2$ -Konzentrierungsmechanismus möglicherweise durch Koppelung an die Photophosphorylierung indirekt von der Lichteinstrahlung abhängig.

Die Leitfähigkeit für  $CO_2$  zwischen der Aussenluft und dem Chloroplastenstroma beeinflusst die Affinität der Photosynthese für  $CO_2$ . Verschiedene Pflanzen erhöhten die Affinität für das photosynthetisch aufgenommene  $CO_2$ , nachdem sie eine gewisse Zeit bei erniedrigter  $CO_2$ -Konzentration photosynthetisiert hatten. (Badger, Kaplan und Berry, 1980; Tsuzuki und Miyachi, 1978; Kriedemann und Wong, 1984). Bei den Wasserpflanzen wurde eine Affinitätsänderung, sowohl der Aktivität der Carboanhydrase zugeschrieben (Hogetsu und Miyachi, 1979; Coleman, Berry, Togasaki und Grossman, 1984), als auch der Fähigkeit der Zellen, anorganischen Kohlenstoff aktiv anzuhäufen (Marcus, Zenvirth, Harel und Kaplan, 1982; Spalding und Ogren, 1982). Da sich beide Eigenschaften verstärken, wenn die  $CO_2$ -Konzentration während

des Wachstums verringert wird, ist offenbar die Carboanhydrase eng mit dem  $\text{CO}_2$  Konzentrierungsmechanismus verbunden (Volokita, Zenvirth, Kaplan und Reinhold, 1984).

In höheren  $\text{C}_3$ -Pflanzen erfolgt der Zutritt von anorganischem Kohlenstoff hauptsächlich in Form von  $\text{CO}_2$ , das in die Blätter hinein diffundiert (Esple und Colman, 1982). Volokita, Kaplan und Reinhold (1981) haben aber gezeigt, dass auch Landpflanzen teilweise  $\text{HCO}_3^-$  aktiv ins Stroma aufnehmen können. Nun lässt sich ein  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus bei Landpflanzen nicht so leicht nachweisen wie zum Beispiel bei einzelligen Algen, deren Suspension im Reagenzglas erforscht werden kann. Er müsste sich aber analog zu den Algen in einer Diskrepanz zwischen der RuBPCO-Kinetik und dem Gasaustausch äussern.

Es ist zu erwarten, dass sich ein allfälliger  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus auch stärker in solchen Blättern höherer Pflanzen auswirkt, die unter verringertem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck gewachsen sind. Diese Hypothese stützt sich auf die Untersuchungen bei Wasserpflanzen. Sie wird auch in der vorliegenden Arbeit geprüft. Dabei wird mit der  $^{14}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ -Methode festgestellt, ob sich die Blätter in ihrem Gasaustausch unterscheiden, die in erhöhter oder in erniedrigter  $\text{CO}_2$ -Konzentration gewachsen sind. Es wird auch untersucht, inwieweit der Gasaustausch von der Enzymkinetik abweicht, und ob sich diese Diskrepanz mit dem  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus begründen lässt.

## Kapitel II

### MATERIAL UND METHODEN

#### 2.1 DIE VERSUCHSPFLANZEN

Die Weisskleepflanzen stammten von einem durch Stecklinge vermehrten Weissklee-Oekotypen aus der Gegend von Chur. Sein ursprünglicher Standort und die anschliessende Anzucht am Institut für Pflanzenbau der ETH-Zürich sind bei Boller (1980) beschrieben.

Die Pflanzen wuchsen in Klimakammern (PGV-36, Conviron, Winnipeg, Kanada) bei einer 15-stündigen Photoperiode mit einer photosynthetisch aktiven Strahlung von  $400 \mu\text{mol Quanten m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Die Temperatur betrug  $20^\circ\text{C}$  am Tag und  $17^\circ\text{C}$  in der Nacht. Die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 70% und 90%. Im Verfahren mit erhöhtem  $\text{CO}_2$  betrug der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck tagsüber 100 Pa und nachts 30 Pa, während er im Verfahren erniedrigten  $\text{CO}_2$ -Partialdrucks am Tage 20 Pa und nachts 30 Pa aufwies.

Zur Photosynthesemessung wurden vollständig entfaltete Blätter verwendet, die der dritten oder vierten von der Stolonenspitze her gezählten Blattnummer entsprachen.

Als Rohmaterial zur Extraktion von Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (RuBPCO) dienten junge, noch nicht vollständig entfaltete Blätter.

## 2.2 DAS ENZYM (RIBULOSEBISPHOSPHAT-CARBOXYLASE-OXYGENASE)

### 2.2.1 Die Extraktion und Aktivierung

Die RuBPCO wurde nach Mächler und Nösberger (1984) aus dem Blattmaterial extrahiert und mittels Ammoniumsulfatfällung und Gelchromatographie gereinigt und dann gefriergetrocknet. Der Proteingehalt wurde photometrisch nach Bensadoun und Weinstein (1976) bestimmt.

Bei der getrennten Bestimmung der kinetischen Eigenschaften von Carboxylase und Oxygenase wurden bestimmte Mengen der gefriergetrockneten RuBPCO in destilliertem Wasser aufgelöst und mit gleichen Volumen von 200 mM Tris-HCl (pH 8,4) gemischt, die 40 mM  $MgCl_2$  und 10 mM  $NaHCO_3$  enthielten. Die Enzymlösung wurde bei 50°C während 20 Minuten aktiviert und dann auf Eis gestellt.

Bei der kombinierten Bestimmung der Carboxylase- und Oxygenaseaktivitäten wurde das Enzympulver in 100 mM Bicin-Puffer (pH 8,2) und 20 mM  $MgCl_2$  sowie 5 mM  $NaHCO_3$  und 10 mM Orthophosphat aufgelöst, während 30 Minuten bei 40°C aktiviert und dann auf Eis gestellt.

### 2.2.2 Der getrennte Carboxylase- und Oxygenasetest

Das Verfahren basiert auf der Methode von Lorimer, Badger und Andrews (1977). Die Carboxylase-Aktivitäten wurden in Teströhrchen und die Oxygenase-Raten in einer Sauerstoff-Elektrode (Hansatech Limited, King's Linn, Norfolk, U.K.) bei gleichen Temperaturen und in demselben Puffer gemessen. Die Testlösung (1  $cm^3$ ) enthielt  $CO_2$ -freie 100 mM Tris-HCl, 20 mM  $MgCl_2$  und 0,4 mM Ribulose-1,5-bisphosphat. Der pH-Wert wurde bei 20°C auf 8,23 eingestellt. Der Temperatureinfluss auf den pH wurde gemessen und später bei der Berechnung der  $CO_2$ -Konzentrationen berücksichtigt.

Beim Carboxylase-Test wurde eine Reihe verschiedener Konzentrationen von  $NaH^{14}CO_3$  in  $CO_2$ -freiem Destwasser hergestellt und der Testmischung zugefügt. Die Reaktion wurde durch Beigabe des Enzyms (ca. 100  $\mu g$  Protein) ausgelöst und nach einer Minute mit 0,1  $cm^3$  2N HCl beendet. Ein Teil

der Testmischung wurde in einem Szintillationsgläschen bei 60°C über Nacht getrocknet und die säurestabile Aktivität mittels Flüssigkeits-Szintillation gemessen.

Beim Oxygenase-Test wurde der Puffer in der Sauerstoff-Elektrode mit verschiedenen O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>-Konzentrationen begast. Die Gase wurden mittels Wösthoff-Pumpen (H. Wösthoff, Bochum, BRD) gemischt. Durch das Zufügen des aktivierten Enzyms, welches vorgängig ebenfalls mit den entsprechenden O<sub>2</sub>-Konzentrationen begast worden war, wurde die Reaktion ausgelöst. Anhand des Sauerstoffabfalls bei Reaktionsbeginn wurde die Oxygenaseaktivität festgestellt.

### 2.2.3 Der kombinierte Aktivitätstest

Nach dem Verfahren von Hall und Keys (1983) wurden unter gleichen Bedingungen beide Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboxylase und Oxygenase in der Sauerstoffelektrode gleichzeitig ermittelt.

Der CO<sub>2</sub>-freie Reaktionspuffer bestand aus 100 mM Bicin und 20 mM MgCl<sub>2</sub>. Sein pH-Wert wurde bei 20°C auf 8,21 eingestellt. Die temperaturbedingten pH-Änderungen wurden gemessen und später in der Berechnung der CO<sub>2</sub>-Konzentrationen berücksichtigt. Zur Einstellung verschiedener O<sub>2</sub>-Konzentrationen wurde das Medium mit reinem O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> begast. Anschliessend wurden NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> (2 mM, mit einer Radioaktivität von 3478·10<sup>6</sup> Bq mol<sup>-1</sup>), Carboanhydrase (50 U cm<sup>-3</sup>) sowie das Enzym RuBPCO (100 µg Protein) zugefügt und während einiger Minuten equilibriert. Die Sauerstoffkonzentrationen zu Beginn der Messungen lagen bei 20 kPa, 38 kPa, 66 kPa und 99 kPa p(O<sub>2</sub>). Durch Zufügen von 0,4 mM Ribulose-1,5-bisphosphat, das mit den jeweiligen O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>-Mischungen begast worden war, wurde die Reaktion ausgelöst und nach 2 Minuten mit 0,1 cm<sup>3</sup> 2N HCl beendet. Die Aktivität der Oxygenase wurde aus dem O<sub>2</sub>-Verbrauch während der Versuchsperiode bestimmt und die der Carboxylase mittels Szintillationsmessung der Radioaktivität der säurestabilen Kohlenstoffmetaboliten festgestellt.

#### 2.2.4 Die Enzyzberechnungen

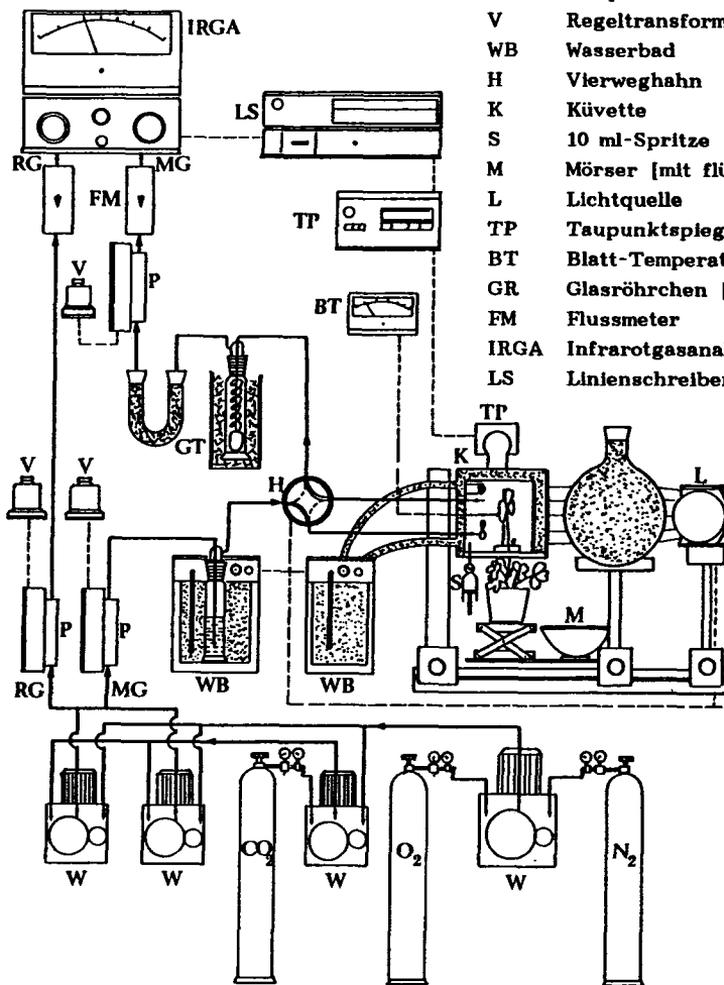
Die  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen in den Lösungen wurden mit Hilfe der Gleichung von Henderson-Hasselbalch berechnet und die pK-Werte - unter Annahme einer Ionenstärke von 0,06 - den Tabellen von Harned und Bonner (1945) entnommen (die pK-Werte betragen 6,326 bei 10°C; 6,281 bei 15°C; 6,242 bei 20°C; 6,210 bei 25°C und 6,184 bei 30°C). Die Löslichkeitskoeffizienten aus Standard-Tabellen dienten der Berechnung der gelösten Sauerstoffkonzentrationen.

Zur Bestimmung der Substrataffinitäten und maximalen Enzymaktivitäten wurden die Achsenabschnitte in doppelt reziproken Darstellungen nach der Berechnung von Wilkinson (1961) ermittelt. Die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  Spezifität wurde sowohl aus den  $K_m$  und  $V_{\max}$  - Werten (getrennter Test) wie aus dem Verhältnis der Carboxylierungs- zu Oxygenierungsraten (kombinierter Test) nach Gleichung (1) berechnet.

### 2.3 DIE GASAUSTAUSCHMESSUNGEN

#### 2.3.1 Die Nettophotosynthese

In einem offenen Gassystem wurde die Nettophotosynthese nicht abgeschnittener Blätter anhand der  $\text{CO}_2$ -Abnahme mit einem Infrarotgasanalysator gemessen (Binos, Leybold-Heraeus, Hanau, BRD) und die Transpiration anhand der Feuchtigkeitsbestimmung mit einem Taupunktspegel (General Eastern, Watertown, Mass. USA) erfasst. Das für die Messung verwendete Gas wurde aus Stickstoff, Sauerstoff und Kohlendioxid in Gasmischpumpen gemischt. Das Messgas floss zur Befeuchtung durch Wasser (pH 4) in die Messkammer, die das Blatt enthielt. Die Durchflussrate betrug dabei  $1 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Die Messanlage mit horizontaler Lichtprojektion war auf einer Optiker-schiene montiert (Figur 4). Als Lichtquelle diente ein Halogen-Projektions-lämpchen (340 W, 36 V) mit Reflektionsspiegel (ERV, General Electric, Cleveland, Ohio, USA). Die Infrarotstrahlung wurde mit einem Calflex C-Filter (Balzers, Balzers, Fürstentum Liechtenstein) und einer 2 cm dicken Wasser-schicht reduziert. Zur gleichmässigen Lichtverteilung sowie zur Infrarotab-sorption diente ein grosser wassergefüllter Rundkolben, der vor der Lampe



LEGENDE

- W Wösthoff-Gasmischpumpe
- RG Referenzgas
- MG Messgas
- P Pumpe
- V Regeltransformer
- WB Wasserbad
- H Vierweghahn
- K Küvette
- S 10 ml-Spritze [ $^{14}\text{CO}_2$ ]
- M Mörser [mit flüssigem  $\text{N}_2$ ]
- L Lichtquelle
- TP Taupunktspiegel
- BT Blatt-Temperaturmessgerät
- GR Glasröhrchen [ $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ ]
- FM Flussmeter
- IRGA Infrarotgasanalyse
- LS Linienschreiber

Figur 4: Das Schema der Photosynthese-Messanlage

stand. Die Küvette bestand aus Kupfer, das elektrostatisch schwarz angefärbt war, Chromstahl und Plexiglas und umfasste ein Volumen von 0,6 dm<sup>3</sup>. Ein kleiner, leistungsstarker Ventilator (Micronel Electronic, Tagelswangen, Schweiz) sorgte für Turbulenz und Wärmeaustausch in der Küvette. Die Lufttemperatur wurde durch Wasser reguliert, das im Mantel und Dach der Küvette zirkulierte. Die Blatttemperatur wurde mit einem 0,05 mm dicken Chromnickel-Aluminiumnickel-Thermofühler gemessen (Omega Engineering Inc., Stamford, CT, USA), welcher an die Blattunterseite geführt werden konnte. Vorgängig der Infrarotgasmessung wurde die Blattfläche unter Verwendung von lichtempfindlichem Pauspapier gemessen. Die Blätter wurden während 30-45 Minuten vor der eigentlichen Messung den experimentellen Bedingungen angepasst.

### 2.3.2 Die Bruttphotosynthese

Nach der Nettophotosynthesemessung im offenen System erfolgte im geschlossenen System die Bestimmung der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Aufnahme.

Eine kleine Gasdruckflasche (4 dm<sup>3</sup>) enthielt trockene synthetische Luft, die nach der Methode von Ludwig und Canvin (1970) mit <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> angereichert war. Mit einer Spritze wurden der Gasflasche 10 cm<sup>3</sup> Luft mit bekanntem <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Gehalt entnommen und in die Küvette eingespritzt. Der Ventilator sorgte für eine rasche Verteilung des Gases. Nach 20 Sekunden wurde der Boden der Küvette, durch den der Blattstiel führte, rasch abgehoben, das Blatt innert 1-2 s in flüssigem Stickstoff abgetötet und anschliessend in einem Oxydationsautomaten verbrannt (Tri-Carb, Packard Instruments Inc., Downers Grove, IL, USA). Die Radioaktivität der Proben wurde im Szintillationszähler (LS-1500, Beckmann, Fullerton, CA, USA) bestimmt.

In einem vorgängigen Verfahren ohne Blatt wurde die Radioaktivität pro Gasvolumen in der Küvette bestimmt, indem eine Probe von 10 cm<sup>3</sup> Luft entnommen und in Carbosorb aufgefangen wurde. Die <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Aufnahme der Blätter verlief während 30 s linear. Die Markierungsdauer von 20 s war somit kurz genug, um eine Messung zu gewährleisten, die nicht durch photorespiriertes und reflexiertes <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> überlagert war.

### 2.3.3 Die Gasaustauschberechnungen

Die Nettophotosyntheserate (F) wurde nach der Formel (5) (Čatský, 1971) berechnet:

$$F \text{ [}\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{]} = \frac{\Delta C \cdot J \cdot 273 \cdot P_{\text{act}} \cdot \sqrt{T} \cdot \sqrt{P_1}}{A \cdot 22,4 \cdot T \cdot 101,33 \cdot \sqrt{T_1} \cdot \sqrt{P_{\text{act}}}} \quad (5);$$

wobei  $\Delta C$  der  $\text{CO}_2$ -Konzentrationsdifferenz [ $\text{cm}^3 \text{ m}^{-3}$ ] entsprach, A der Blattfläche [ $\text{m}^2$ ], J der Durchflussrate [ $\text{dm}^3 \text{ s}^{-1}$ ],  $P_{\text{act}}$  dem aktuellen Barometer-Luftdruck [durchschnittlich 96,66 kPa],  $P_1$  dem Kalibrierungs-luftdruck des Flussmeters [101,33 kPa], T der Umgebungstemperatur [durchschnittlich 293°K] und  $T_1$  der Kalibrierungstemperatur des Flussmeters [288°K].

Die stomatäre Leitfähigkeit ( $k_g$ ) wurde aus den Temperatur- und Transpirationsmessungen nach Jarvis (1971) bestimmt. Dazu wurden die Partialwasserdrucke ( $p(\text{H}_2\text{O})$ ) mit der Formel (6) berechnet:

$$p(\text{H}_2\text{O}) \text{ [kPa]} = 10^{([8,524 T/(T+273)] - 0,214)} \quad (6);$$

wobei T dem Taupunkt in °C entspricht (Lange, 1979).

Auch das Verhältnis der molekularen Diffusionskoeffizienten von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  (bei 20°C betrug es 0,61) wurde in Berechnung von  $k_g$  einbezogen:

$$k_g \text{ [mmol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}\text{]} = \frac{[p(\text{H}_2\text{O})_a - p(\text{H}_2\text{O})_o] \cdot 0,61 \cdot J \cdot 273 \cdot P_{\text{act}} \cdot \sqrt{T} \cdot \sqrt{P_1}}{[p(\text{H}_2\text{O})_i - p(\text{H}_2\text{O})_a] \cdot 10^3 \cdot A \cdot 22,4 \cdot T \cdot 101,3 \cdot \sqrt{T_1} \cdot \sqrt{P_{\text{act}}}} \quad (7);$$

wobei  $p(\text{H}_2\text{O})_a$  aus der Taupunkttemperatur der Küvette berechnet wurde,  $p(\text{H}_2\text{O})_o$  aus der Taupunkttemperatur des in die Küvette einströmenden Messgases und  $p(\text{H}_2\text{O})_i$  aus der Blattemperatur (unter der Annahme, dass die interzelluläre Luft wassergesättigt war). Die stomatäre Leitfähigkeit wurde somit aus dem Verhältnis der Transpiration zum Gradienten des Wasserdampfdruckes zwischen Interzellularraum und Aussenluft berechnet. Durch die starke und gleichförmige Luftturbulenz in der Küvette wurde der Diffusionswiderstand der Blattgrenzschicht klein gehalten.

Die Bruttophotosyntheserate ( $P^1$ ) wurde aus der  $^{14}\text{CO}_2$ -Aufnahme berechnet und dabei Folgendes berücksichtigt:

- Die Abnahme der spezifischen Radioaktivität in der Küvette infolge des aus dem Blatt austretenden photorespirierten  $\text{CO}_2$ .

- Die Diskriminierung des  $^{14}\text{CO}_2$  gegenüber dem  $^{12}\text{CO}_2$  bei der Aufnahme ins Blatt.
- Die geringe  $\text{CO}_2$ -Konzentrationsveränderung bei der Messung im geschlossenen System im Vergleich zur Nettphotosynthesemessung.
- Die Unterschätzung der Bruttphotosynthese infolge der Reflexierung des photorespirierten  $\text{CO}_2$ .

Dazu war vorerst die Bestimmung der  $\text{CO}_2$ -Konzentration in der Küvette bei Markierungsbeginn ( $\text{Ca}'$ ) nötig:

$$\text{Ca}' [\text{cm}^3\text{m}^{-3}] = \frac{[(\text{Ce} - \Delta\text{C}) \cdot (\text{V}_k - \text{V}_s)]}{\text{V}_k} + (\text{C}_s \cdot \text{V}_s) \quad (8);$$

wobei  $\text{C}_e$  der  $\text{CO}_2$ -Konzentration der einströmenden Luft [ $\text{cm}^3\text{m}^{-3}$ ] entsprach,  $\Delta\text{C}$  der  $\text{CO}_2$ -Konzentrationsveränderung während der Messung,  $\text{V}_k$  dem Küvettenvolumen [0,6  $\text{dm}^3$ ],  $\text{V}_s$  dem Spritzenvolumen [0,01  $\text{dm}^3$ ] und  $\text{C}_s$  der  $\text{CO}_2$ -Konzentration in der Spritze [1030  $\text{cm}^3\text{m}^{-3}$ ].

Die  $\text{CO}_2$ -Abnahme während der Markierung ( $\Delta\text{Ca}'$ ) wurde vorgängig bestimmt:

$$\Delta\text{Ca}' [\text{cm}^3\text{m}^{-3}] = (\text{F} \cdot \text{A} \cdot \text{t} \cdot 22,4) / \text{V}_k \quad (9);$$

wobei  $t$  der Markierungsdauer von 20 s entsprach.

Da sich die Radioaktivität der Küvettenluft (DPML) im Laufe der Markierung infolge der Respiration verringerte, wurde ein durchschnittlicher Wert ermittelt (DPML'):

$$\text{DPML}' [\text{cm}^3\text{m}^{-3}] = \text{DPML} \left( \frac{\text{Ca}' - \Delta\text{Ca}' - [\Delta\text{Ca}'(\text{P}-\text{F})/\text{F}]}{[\text{Ca}' - \Delta\text{Ca}']} + 1 \right) / 2 \quad (10);$$

wobei für das Verhältnis  $(\text{P}-\text{F})/\text{F}$  0,1 bei  $10^\circ\text{C}$  eingesetzt wurde; 0,2 bei  $20^\circ\text{C}$  und 0,3 bei  $30^\circ\text{C}$ .

Damit konnte eine mittlere  $^{14}\text{CO}_2$ -Aufnahme ( $\ddagger$ ) berechnet werden:

$$\ddagger [\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}] = \frac{\text{DPMA} \cdot \text{Ca}' \cdot 273 \cdot \text{P}_{\text{act}}}{\text{DPML}' \cdot \text{A} \cdot \text{t} \cdot 22,4 \cdot \text{T} \cdot 101,33} \quad (11);$$

wobei DPMA der Radioaktivität des Blattes [dpm] entsprach und t der Markierungsdauer.

Anschliessend wurde die  $^{14}\text{CO}_2$ -Aufnahme wegen der Diskriminierung des  $^{14}\text{CO}_2$  gegenüber dem  $^{12}\text{CO}_2$  bei der Diffusion in der Gasphase [ $k_{12}/k_{14} = 1,0088$ ] und bei der Carboxylierung [ $k_{12}/k_{14} = 1,0568$ ] (O'Leary, 1981) korrigiert:

$$1/\phi' = 1/(1,0568\phi) - 1008,8/(1,0568k_g[\text{Ca}' - \Delta\text{Ca}'/2]) + 10^3/(k_g[\text{Ca} - \Delta\text{Ca}'/2]) \quad (12);$$

wobei  $\phi'$  der  $^{14}\text{CO}_2$ -Aufnahme entsprach, die um den Betrag der  $^{14}\text{C}$ -Diskriminierung korrigiert worden war.

Die Einspritzung von  $10 \text{ cm}^3$   $^{14}\text{CO}_2$ -haltiger Luft (103 Pa  $p(\text{CO}_2)$ ) ins geschlossene System verursachte eine kleine Abweichung vom Wert der  $\text{CO}_2$ -Konzentration, die während der Nettphotosynthesemessung herrschte. Deshalb wurde  $\phi'$  mit Hilfe von Photosynthesemessungen bei verschiedenen  $\text{CO}_2$  Konzentrationen korrigiert und die  $^{14}\text{CO}_2$ -Aufnahme nun als  $P''$  bezeichnet:

$$P'' [\mu\text{mol CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}] = \phi' - m \cdot (\text{Ca}' - \Delta\text{Ca}'/2 - \text{Ca}) \quad (13);$$

wobei Ca der  $\text{CO}_2$ -Konzentration [ $\text{cm}^3\text{m}^{-3}$ ] in der Küvette entsprach, die vor der Einspritzung von  $^{14}\text{CO}_2$  geherrscht hatte, und m der aus  $\text{CO}_2$ -Photosynthesekurven geschätzte Korrekturfaktor (zwischen 0 und 0,11 [ $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}/\Delta \text{cm}^3\text{m}^{-3} \text{CO}_2$ ]) war.

Die Unterschätzung der Bruttphotosynthese infolge der Reflexion des respirierten  $\text{CO}_2$  konnte teilweise berücksichtigt werden. Interzelluläres  $\text{CO}_2$ , das aus der Aussenluft und der Respiration stammte, wurde gleichermassen fixiert. Damit konnten die gesamte interzelluläre  $\text{CO}_2$ -Konzentration ( $C_1$ ) sowie der mit  $^{14}\text{CO}_2$  markierte Anteil ( $^{14}\text{C}_1$ ) nach dem ersten Fick'schen Gesetz berechnet werden:

$$C_1 = \text{Ca} \cdot 10^{-6} - F / k_g \cdot 10^3 \quad (14);$$

$$^{14}\text{C}_1 = \text{Ca} \cdot 10^{-6} - P'' / k_g \cdot 10^3 \quad (15);$$

wobei Ca der  $\text{CO}_2$ -Konzentration in der Küvette während der Nettphotosynthesemessung und vor der Einspritzung des  $^{14}\text{CO}_2$  entsprach [ $\text{cm}^3\text{m}^{-3}$ ].

wobei Ca der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Küvette während der Nettophotosynthesemessung und vor der Einspritzung des <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> entsprach [cm<sup>3</sup>m<sup>-3</sup>].

Die Bruttophotosynthese (P'), die um den Betrag des respirierten und refixierten CO<sub>2</sub> korrigiert worden war, liess sich nach der Formel (16) berechnen.

$$P' [\mu\text{molCO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}] = P'' \cdot (k_g \cdot \text{Ca} \cdot 10^{-3} - F) / (k_g \cdot \text{Ca} \cdot 10^{-3} - P'') \quad (16).$$

#### 2.3.4 Die Datenverarbeitung

Die Messdaten wurden teils mit einem Handrechner verarbeitet und teils mit dem Computer der Universität Zürich. Die Photosyntheserisiken und die graphischen Darstellungen wurden mit SAS-Programmen (Statistical Analysis System, Institute Inc. Cary, NC, USA) und die Kurvenangleichungen nach dem Modell von Marschall und Biscoe (1980) mit einem Programm von B. Boller ausgeführt.

## Kapitel III

### RESULTATE UND DISKUSSION

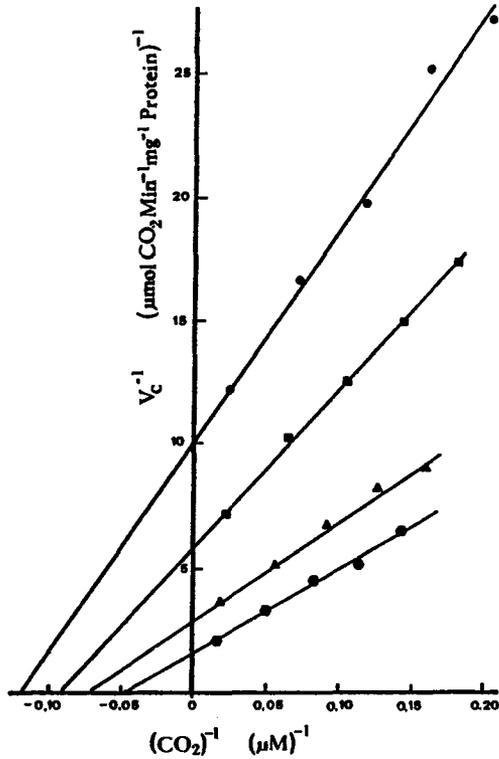
#### 3.1 DIE EIGENSCHAFTEN DER GEREINIGTEN RIBULOSEBISPHOSPHAT-CARBOXYLASE-OXYGENASE

Die Charakterisierung der gereinigten RuBPCO bei verschiedenen Temperaturen wurde auf zwei verschiedenen Wegen vorgenommen. Einerseits wurden die kinetischen Konstanten  $K_m$  und  $V_{max}$  sowohl der Carboxylase als auch der Oxygenase ermittelt (getrennter Test). Andererseits wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten der Carboxylase und Oxygenase gleichzeitig bei verschiedenen  $CO_2$ - und  $O_2$ -Konzentrationen gemessen (kombinierter Test). Aufgrund der Gleichung (1) war damit die  $CO_2/O_2$ -Spezifität *in vitro* bestimmbar.

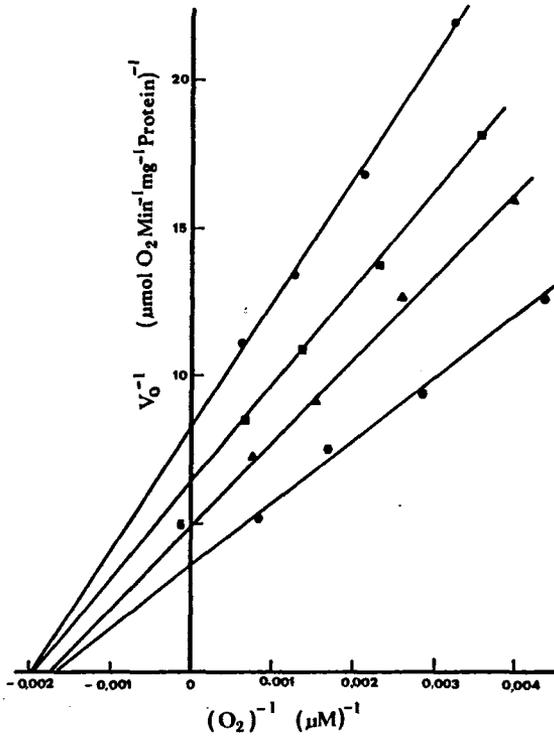
Die Aktivitäten der Carboxylase (Figur 5) und der Oxygenase (Figur 6) wurden in Abhängigkeit der Substratkonzentrationen gemessen und in doppelt reziproken Darstellungen aufgetragen. Die sich daraus ergebenden kinetischen Konstanten sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

Im folgenden werden die Messungen mit Daten aus der Literatur verglichen, und anschliessend wird die Temperaturabhängigkeit der kinetischen Konstanten und der Reaktionsgeschwindigkeiten beurteilt.

Weil  $CO_2$  nicht nur Substrat ist, sondern auch zur Aktivierung der RuBPCO dient (Badger und Lorimer, 1976), ist die *in vitro* Bestimmung schwierig. So weisen denn auch die Literaturwerte der Substrataffinitäten Unterschiede auf, die wohl auf methodische Probleme zurückzuführen sind. Die aus der Literatur entnommenen Michaeliskonstanten und  $CO_2/O_2$  Spezifitäten verschiedener höherer  $C_3$ -Pflanzen sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.



Figur 5: Lineweaver-Burk-Diagramm der Carboxylase. Die aus drei Wiederholungen ermittelten Carboxylaseraten der gereinigten RuBPCO bei 10°C (●), 15°C (■), 20°C (▲) und 25°C (◆) wurden durch Regressionsgeraden verbunden, die in den Schnittpunkten mit der Abszisse die Enzymaffinität für  $CO_2$  angeben und in den Schnittpunkten mit der Ordinate die maximalen Carboxylierungsraten.



Figur 6: Lineweaver-Burk-Diagramm der Oxygenase. Die aus zwei Wiederholungen ermittelten Oxygenaseraten der gereinigten Weissklee-RuBPCO bei 10°C (●), 15°C (■), 20°C (▲) und 25°C (◆) wurden durch Regressionsgeraden verbunden, die in den Schnittpunkten mit der Abszisse die Enzymaffinitäten für O<sub>2</sub> angeben und in den Schnittpunkten mit der Ordinate die maximalen Oxygenierungsraten.

Tabelle 1: Die Temperaturabhängigkeit der kinetischen Konstanten gereinigter Weissklee-RuBPCO.  $V_o$  und  $V_c$  sind die Maximalraten der Oxygenase und der Carboxylase;  $K_o$  und  $K_c$  die Michaeliskonstanten für  $O_2$  und  $CO_2$ . Die mittleren Fehler (in Klammern) basieren auf sieben bis neun Bestimmungen.

Temp. [°C]	$V_o$ [ $\mu\text{molO}_2\text{Min}^{-1}$ $\text{mg}^{-1}\text{Protein}$ ]	$K_o$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_c$ [ $\mu\text{molCO}_2\text{Min}^{-1}$ $\text{mg}^{-1}\text{Protein}$ ]	$K_c$ [ $\mu\text{M}$ ]
10	0,12 (0,008)	520 (93,3)	0,10 (0,003)	8,5 (0,69)
15	0,15 (0,003)	521 (26,7)	0,17 (0,004)	11,0 (0,59)
20	0,21 (0,017)	598 (104,8)	0,34 (0,011)	14,2 (1,10)
25	0,27 (0,023)	619 (104,9)	0,60 (0,016)	20,8 (1,16)

Tabelle 2: Vergleich von Literaturwerten der Carboxylase- und Oxygenaseaffinitäten der RuBPCO ( $K_c$  und  $K_o$ ) und der  $CO_2/O_2$ -Spezifität ( $S$  *in vitro*).

Pflanzenart	Temp. [°C]	$K_c$ [ $\mu\text{M}$ ]	$K_o$ [ $\mu\text{M}$ ]	$S$ <i>in vitro</i>
Triticum aestivum <sup>1)</sup>	20	15	-	-
Atriplex glabruscula <sup>2)</sup>	25	27	328	67
Nicotiana tabacum <sup>3)</sup>	25	11	650	77
Lolium perenne <sup>3)</sup>	25	16	500	80
Trifolium repens <sup>4)</sup>	25	21	619	66

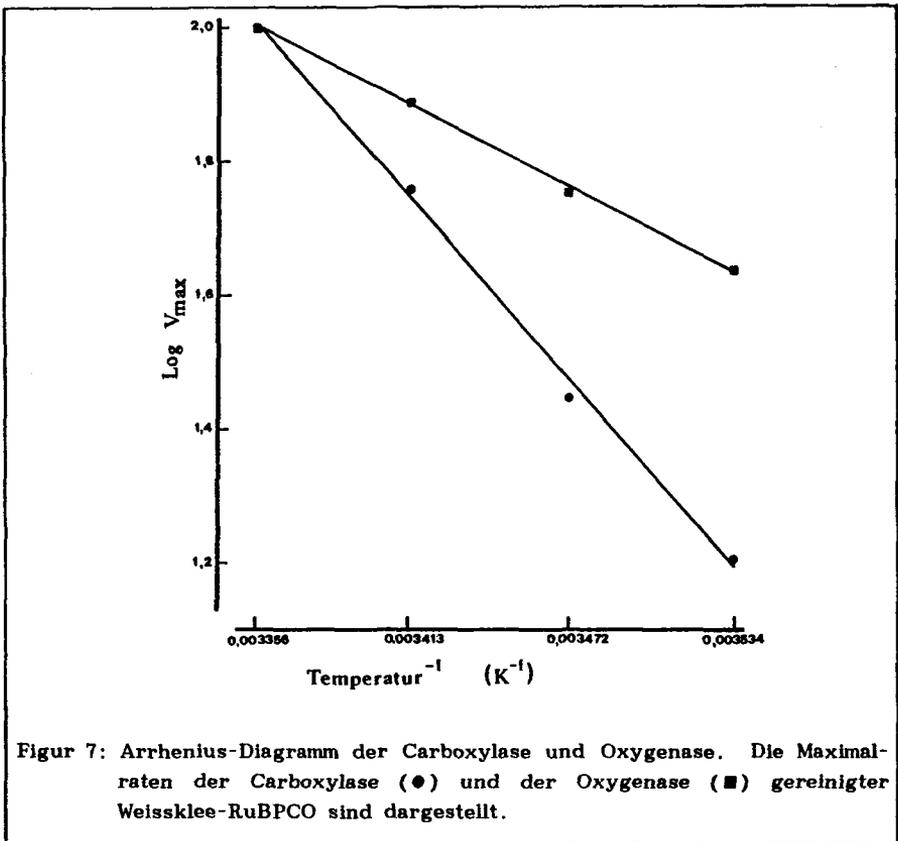
<sup>1)</sup> Mächler, Keys und Cornelius (1980)

<sup>2)</sup> Badger und Collatz (1977)

<sup>3)</sup> Jordan und Ogren (1983)

<sup>4)</sup> Lehnherr, Mächler und Nösberger (1985)

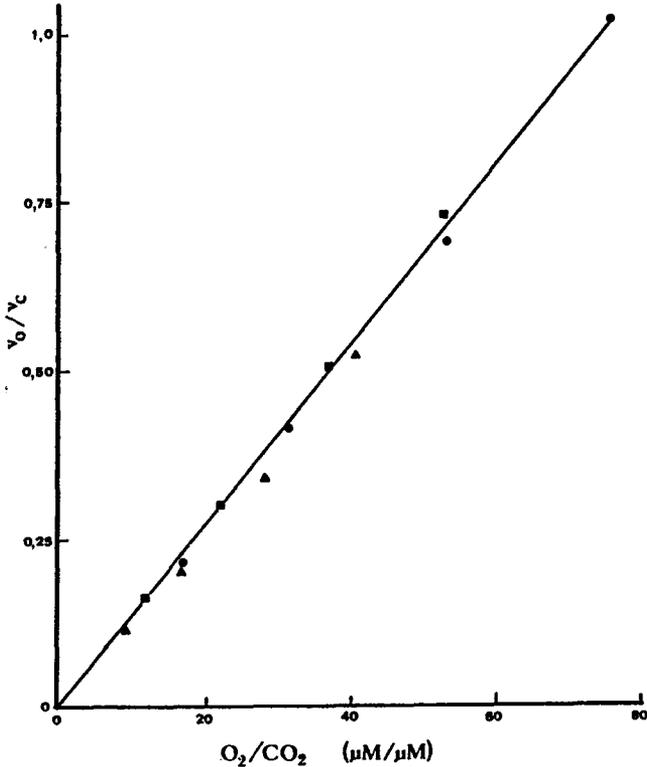
Die Aktivierungsenergie bestimmt als energetisches Hindernis die Reaktionsgeschwindigkeit. Aus dem Arrhenius-Diagramm sind die Aktivierungsenergie der Carboxylierung ( $E_c = 85,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) und diejenige der Oxygenierung ( $E_o = 39,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) für den Temperaturbereich von  $10^\circ\text{C}$  bis  $25^\circ\text{C}$  ersichtlich (Figur 7). Die Carboxylierung nimmt also mit der Temperatur stärker zu als die Oxygenierung. Auch die Aktivierungsenergien der Michaeliskonstanten dienen der Beurteilung des Temperatureinflusses auf die Substrataffinitäten ( $[E]K_c = 48,8 \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $[E]K_o = 8,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Die Michaeliskonstante der Oxygenase verhielt sich damit praktisch temperaturunabhängig, im Gegensatz zur Michaeliskonstante der Carboxylase, die mit der Temperatur anstieg.



Die Gleichungen (17) und (18) zeigen, wie die kinetischen Konstanten der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro* bestimmen, und wie sich dessen Aktivierungsenergie zusammensetzt.

$$S \text{ in vitro} = V_c \cdot K_o / V_o \cdot K_c \quad (17);$$

$$[E] S = ([E]V_c + [E]K_o) - ([E]V_o + [E]K_c) \quad (18).$$



Figur 8: Die Bestimmung der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro*. Das Verhältnis von  $v_o$  zu  $v_c$  in Abhängigkeit der Verhältnisse gelöster Konzentrationen von  $\text{O}_2$  zu  $\text{CO}_2$  wurde in kombinierten Tests der RuBPCO bei  $10^\circ\text{C}$  (●),  $20^\circ\text{C}$  (■) und  $30^\circ\text{C}$  (▲) bestimmt. Die Konzentration des  $\text{NaHCO}_3$  blieb konstant, während die des Sauerstoffs variiert wurde. Der Kehrwert der Kurvensteilheit entspricht der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro*. Die Punkte stellen Durchschnittswerte von zwei bis drei Bestimmungen dar.

Die Aktivierungsenergie der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro* betrug - berechnet nach der Formel (18) - nur  $5,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Der Einfluss der Temperatur auf die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro* war gering, weil sich die Temperaturabhängigkeiten der kinetischen Konstanten gegenseitig aufhoben.

Die Temperaturunabhängigkeit der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro* wurde auch mit den Messungen des kombinierten Tests der RuBPCO bestätigt. Die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro* liess sich dabei nach der Gleichung (1) aus den Carboxylase- und Oxygenaseraten bestimmen. In der Figur 8 wurden die Verhältnisse der Oxygenase- zur Carboxylaseaktivität bei  $10^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$  gegen die Verhältnisse der Konzentrationen von  $\text{O}_2$  zu  $\text{CO}_2$  aufgetragen. Nach Jordan und Ogren (1981) entspricht der Kehrwert der Kurvensteilheit in dieser Darstellung der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität. Die Messpunkte lagen auf Geraden derselben Neigung. Daraus ist ersichtlich, dass die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro* von der Temperatur nicht berührt worden ist.

Durch die Experimente mit der gereinigten RuBPCO liess sich die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro* bestimmen. Sie dient im folgenden zur Charakterisierung der RuBPCO *in vitro* im Vergleich zu den Eigenschaften des Gasaustausches.

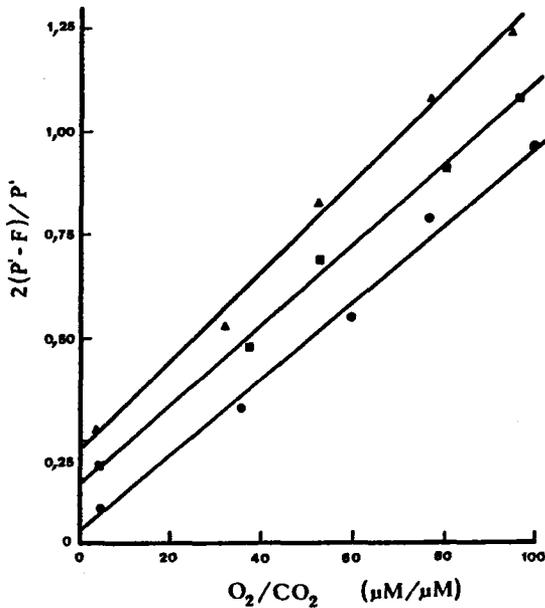
### 3.2 DIE EIGENSCHAFTEN DES GASAUSTAUSCHES IM VERGLEICH MIT DEN ENZYMEIGENSCHAFTEN

Zur Charakterisierung des Gasaustausches wurde die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* bestimmt. Es stellte sich heraus, dass diese - im Unterschied zur  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro* - abhängig war von der Lichtintensität, der Temperatur, der  $\text{CO}_2$ -Konzentration während der Messung und von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration während der Anzucht. Die Einflüsse dieser Faktoren werden im folgenden besprochen.

#### 3.2.1 Der Lichteinfluss auf das Verhältnis der Photosynthese zur Photorespiration

Auf Grund von  $^{14}\text{CO}_2$ - $^{12}\text{CO}_2$ -Messungen bei verschiedenen Lichtintensitäten an Blättern, die bei  $20^\circ\text{C}$  und bei 33 Pa  $p(\text{CO}_2)$  gewachsen waren, wurde das Verhältnis der Photorespiration zur Bruttophotosynthese bestimmt und zwar bei  $20^\circ\text{C}$ , konstantem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck (30 Pa) und variierten  $\text{O}_2$ -Partialdrücken (2-80 kPa). Die Figur 9 zeigt die Verhältnisse von Photorespiration zu Bruttophotosynthese in Abhängigkeit der Konzentrationsverhältnisse von gelöstem  $\text{O}_2$  zu gelöstem  $\text{CO}_2$ . Diese Darstellung der *in vivo*-Daten entspricht der Figur 8 mit *in vitro*-Daten. Die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* wird ebenfalls aus dem Kehrwert der Kurvensteilheit bestimmt.

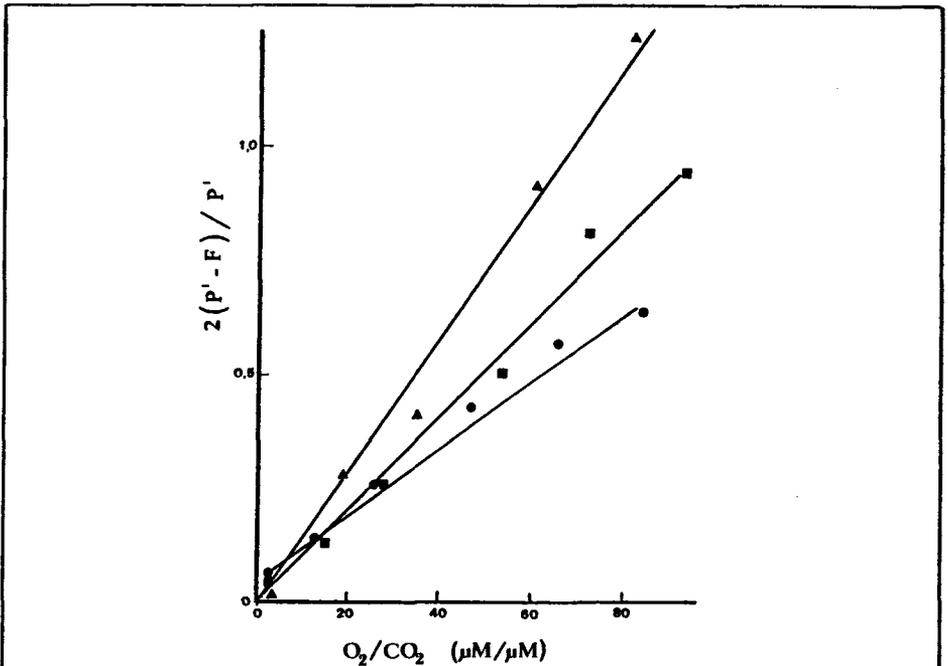
Das Steigungsmass der Geraden war bei allen Lichtintensitäten ähnlich. Daraus folgt, dass sich die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* praktisch lichtunabhängig verhielt. Die Verbindungsgeraden liefen bei hoher Lichtintensität beinahe durch den Achsenschnittpunkt. Bei geringer Lichtstärke schnitten sie die Ordinate ausserhalb des Nullpunktes, womit das Verhältnis von  $\text{CO}_2$  Abgabe zu  $\text{CO}_2$ -Aufnahme bei sehr kleinem  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ -Verhältnis grösser als null war. Dies deutet auf die Dunkelrespiration hin, die bei geringer Lichtintensität stärker ins Gewicht fiel. Bei 2000  $\mu\text{mol}$  Quanten  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  erfolgte allerdings keine nennenswerte Ueberlagerung der Photorespiration durch Dunkelrespiration mehr. Die weiteren Experimente sind bei dieser hohen Lichtintensität durchgeführt worden, um eine allfällige Interferenz mit der Dunkelrespiration zu vermindern.



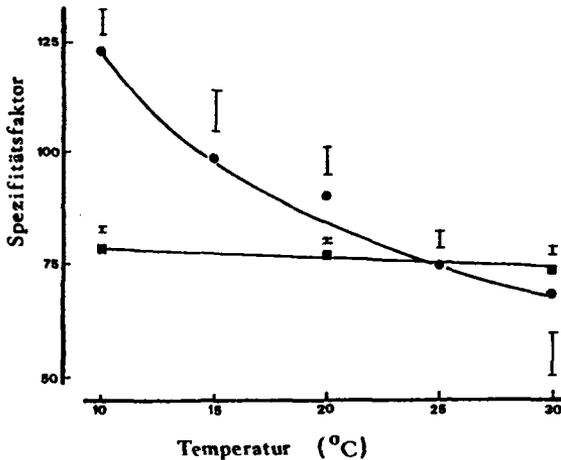
Figur 9: Die Bestimmung der  $CO_2/O_2$ -Spezifität *in vivo* bei verschiedenen Lichtintensitäten. Das Verhältnis von Photorespiration zu Bruttphotosynthese  $[2(P'-F)/P']$  wurde gegen das Verhältnis gelöster Konzentrationen von  $O_2$  zu  $CO_2$  aufgetragen. Die reziproken Kurvensteigungen entsprechen den  $CO_2/O_2$ -Spezifitäten *in vivo*. Die Photosyntheseraten der Blätter, die bei  $20^\circ C$  und  $33\ Pa\ p(CO_2)$  gewachsen waren, wurden bei  $2000$  ( $\bullet$ ), bei  $800$  ( $\blacksquare$ ) und bei  $400$  ( $\blacktriangle$ )  $\mu mol\ Quanten\ m^{-2}\ s^{-1}$  gemessen, jeweils bei  $20^\circ C$ ,  $33\ Pa\ p(CO_2)$  und bei von  $2$  bis  $80\ kPa$  variiertem  $p(O_2)$ . Die Punkte stellen Mittelwerte von zwei bis acht Messungen dar.

### 3.2.2 Der Einfluss der Temperatur und der CO<sub>2</sub>-Konzentration auf das Photosynthese/Photorespirationsverhältnis

Mit der <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-Methode wurden Bruttophotosynthese und Photorespiration bei 10°C, 20°C und 30°C bestimmt. Dabei wurde einerseits der CO<sub>2</sub>-Partialdruck bei 30 Pa konstant gehalten, andererseits der O<sub>2</sub>-Partialdruck von 2 kPa bis 80 kPa variiert. Die Darstellung (Figur 10) zeigt Geraden, die den Achsenschnittpunkt kreuzen. Mit zunehmender Temperatur vergrößerte sich das Steigungsmass der Geraden. Damit fiel die CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität *in vivo* mit steigender Temperatur ab. Sie betrug 123 bei 10°C und 69 bei 30°C.



Figur 10: Die Bestimmung der CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität *in vivo*. Die Messungen erfolgten bei 10°C (●), 20°C (■) und 30°C (▲), jeweils bei 2000 µmol Quanten m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>, bei 33 Pa p(CO<sub>2</sub>) und bei von 2-80 kPa variiertem p(O<sub>2</sub>). Die Verhältnisse von Photorespiration zu Bruttophotosynthese [2(P'-F)/P'] wurden in Abhängigkeit der Verhältnisse gelöster Konzentrationen von O<sub>2</sub> zu CO<sub>2</sub>, die sich im Gleichgewicht mit den Partialdrücken des Interzellularraumes befanden, aufgetragen. Die reziproken Werte der Kurvenneigungen entsprechen den CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifitäten *in vivo*. Die Symbole stellen Durchschnittswerte zweier Bestimmungen dar.



Figur 11: Der Einfluss der Temperatur auf die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifitäten *in vivo* (●) und *in vitro* (■). Die Werte *in vivo* wurden aus Gasaustauschmessungen bei 30 Pa  $p(\text{CO}_2)$ , 21 kPa  $p(\text{O}_2)$  und 2000  $\mu\text{mol Quanten m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ermittelt und diejenigen *in vitro* aus Enzymmessungen des kombinierten Tests. Die vertikalen Balken stellen die mittleren Fehler von zwei bis drei Einzelbestimmungen dar.

Figur 11 vergleicht die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifitäten *in vivo* und *in vitro* bei verschiedenen Temperaturen. Die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* nimmt mit sinkender Temperatur zu, während dem sie *in vitro* paraktisch konstant bleibt.

Der Temperatureinfluss auf die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* lässt sich auch mit Berechnungen aus Literaturdaten belegen (Tabelle 3). Er ist sowohl aus  $^{14}\text{CO}_2$ - $^{12}\text{CO}_2$ -Experimenten mit niedrigem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck ersichtlich als auch aus Bestimmungen der  $\text{CO}_2$ -Kompensationskonzentration.

Tabelle 3: Die CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität *in vivo* bei verschiedenen Temperaturen und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen. Vergleich der Daten unterschiedlicher Bestimmungsart und Herkunft.

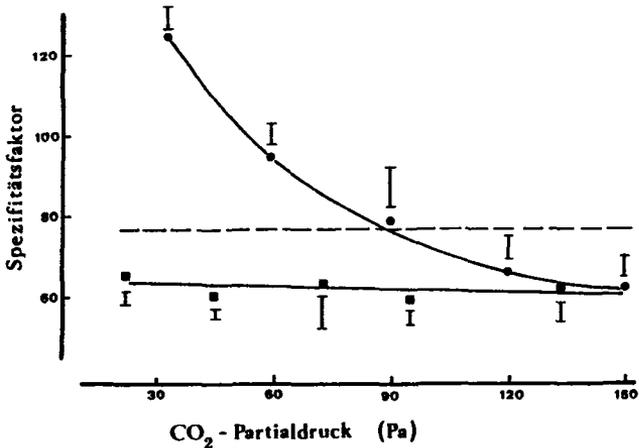
Pflanzenart	Methode	Temperatur [°C]	CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> -Spezifität <i>in vivo</i>	
			bei 20 Pa p(CO <sub>2</sub> )	bei 40 Pa p(CO <sub>2</sub> )
Helianthus annuus <sup>1)</sup>	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> -	16	126	73
	<sup>12</sup> CO <sub>2</sub>	25	118	78
		33	71	61
Trifolium repens <sup>2)</sup>	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> -	10	bei 30 Pa p(CO <sub>2</sub> )	bei 90 Pa p(CO <sub>2</sub> )
			123	78
	<sup>12</sup> CO <sub>2</sub>	20	96	69
		30	71	64
Triticum sativum <sup>3)</sup>	CO <sub>2</sub> -	13	bei 3-6 Pa p(CO <sub>2</sub> )	
	Kompensations- konzentration	19	134	
		31	112	73
Lolium perenne <sup>4)</sup>	CO <sub>2</sub> -	10	bei 3-6 Pa p(CO <sub>2</sub> )	
	Kompensations- konzentration	20	104	
		30	93	59

<sup>1)</sup> Fock, Klug und Canvin (1979)

<sup>2)</sup> Lehnherr et al. (1985)

<sup>3)</sup> Jolliffe und Tregunna (1968)

<sup>4)</sup> Azcón-Bieto, Farquhar und Caballero (1981)



Figur 12: Der Einfluss des interzellulären CO<sub>2</sub>-Partialdruckes auf die CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität *in vivo* bei 10°C (●) und bei 30°C (■). Das Verhältnis der Partialdrücke von CO<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub> wurde während des Experimentes durch Anpassung des O<sub>2</sub>-Partialdruckes konstant gehalten (15 · 10<sup>-6</sup>). Die Berechnung der CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifitäten basiert auf den Konzentrationen gelösten Sauerstoffs und Kohlendioxids. Die vertikalen Balken stellen die mittleren Fehler von drei bis vier Bestimmungen dar. Die CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität *in vitro* ist als gestrichelte Linie eingetragen.

Die in der Einleitung angetönte Frage, worauf die Temperaturabhängigkeit des Verhältnisses der Photosynthese zur Photorespiration beruhe, lässt sich zum Teil beantworten: Sie ist weder durch die enzymkinetischen Eigenschaften bedingt, noch ist das temperaturabhängige Löslichkeitsverhältnis von CO<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub> ausschliesslich massgebend. In Figur 12 wurde der Einfluss des Löslichkeitsverhältnisses berücksichtigt, indem die Konzentrationen gelöster Substrate verwendet wurden. Offenbar tritt hier ein Faktor in Erscheinung, der unabhängig von den Enzymeligenschaften ist, und der bei niedrigen Temperaturen ein Abweichen des Gasaustausches von der Enzymkinetik verursacht.

Eine Bestätigung der Beobachtung, dass eine Diskrepanz zwischen dem Gasaustausch und der Enzymkinetik bei tiefer Temperatur vorliegt, brachte der Vergleich der  $\text{CO}_2$ -Abhängigkeit der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität bei  $10^\circ\text{C}$  und  $30^\circ\text{C}$ : Figur 12 zeigt, dass sich die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* bei  $30^\circ\text{C}$  unabhängig von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration verhält, wie es aufgrund der Enzymeigenschaften zu erwarten ist; während sie bei  $10^\circ\text{C}$  mit abnehmender  $\text{CO}_2$ -Konzentration zunimmt. Diese  $\text{CO}_2$ -Abhängigkeit ist erstaunlich und steht im Gegensatz zur RuBPCO-Kinetik. Die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro* (gestrichelt eingetragen) ist von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration unabhängig. Er liegt bei  $30^\circ\text{C}$  leicht über der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo*. Bei  $10^\circ\text{C}$  und bei niedrigen  $\text{CO}_2$ -Partialdrücken ist die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* aber deutlich grösser als die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro*.

Auch Berechnungen unter Verwendung von Literaturdaten aus  $^{14}\text{CO}_2$ - $^{12}\text{CO}_2$ -Experimenten, die bei verschiedenen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen ausgeführt worden sind, belegen diese Abhängigkeit der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration (Tabelle 3).

Das Abweichen des Gasaustausches von der RuBPCO-Kinetik kann jedoch nicht durch den Einfluss der Dunkelrespiration erklärt werden: Falls die Dunkelrespiration, die bei 2 kPa  $\text{O}_2$  gesättigt ist (Forrester, Krotkov und Nelson, 1966), einen Einfluss hätte, würden die geraden Linien in der Figur 10 nicht durch den Achsennullpunkt gehen. Die  $\text{CO}_2$ -Abhängigkeit der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität (Figur 12) kann nicht der Dunkelrespiration zugeschrieben werden, da diese - soweit uns bekannt ist - nicht von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration berührt wird. Nach dem Modell von Farquhar, von Caemmerer und Berry (1980) beeinflusst die Dunkelrespiration das Steigungsmass der Geraden nicht; dieses wird aber mit der Temperatur verändert (Figur 10).

Die bei niedrigen Temperaturen auffällige Abweichung der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* von der RuBPCO-Kinetik *in vitro* lässt deshalb einen endogenen Mechanismus vermuten, der bei geringen Temperaturen und durchschnittlichen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen das interne Konzentrationsverhältnis von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{O}_2$  zugunsten des  $\text{CO}_2$  verschiebt. Dieser hypothetische  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus in den Mesophyllzellen könnte somit den Unterschied zwischen dem Gaswechsel und der RuBPCO-Kinetik erklären: Falls ein  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungssystem aktiv ist, wird nämlich die  $\text{CO}_2$  Konzentration am Enzym über die berechnete Konzentration im Interzellularräum hinaus erhöht.

Die Bestimmung der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* nach der Formel (3) (siehe Einleitung) unter Verwendung einer zu tiefen  $\text{CO}_2$ -Konzentration müsste zu Werten führen, die über den erwarteten  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifitäten *in vitro* liegen.

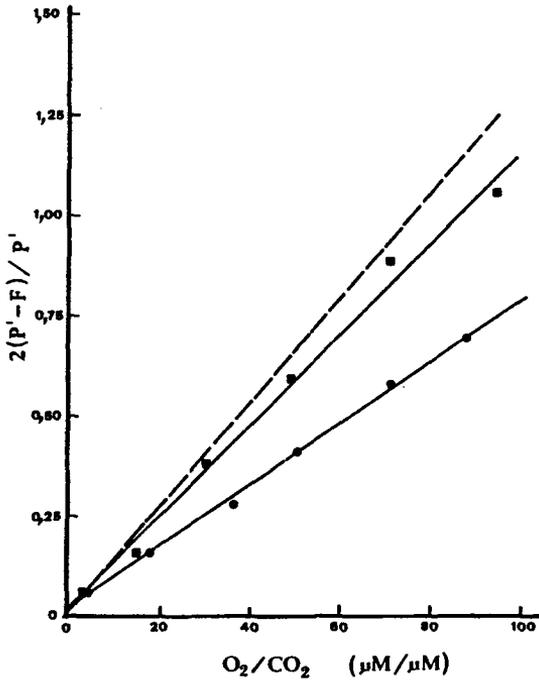
Es ist anzunehmen, dass ein  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus bezüglich  $\text{CO}_2$  einer Sättigungskinetik folgt und damit bei tiefen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen am wirkungsvollsten ist. Daher kann auch erwartet werden, dass die Diskrepanz zwischen dem Gasaustausch und der RuBPCO-Kinetik bei tiefen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen am grössten ist. Dies wird in der Figur 12 bestätigt: Die höchsten  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifitäten werden bei niedriger  $\text{CO}_2$ -Konzentration erreicht, die auch für die Pflanzen relevant ist.

### 3.2.3 Der Einfluss der CO<sub>2</sub>-Konzentration während der Anzucht auf das Photosynthese-Photorespirationsverhältnis

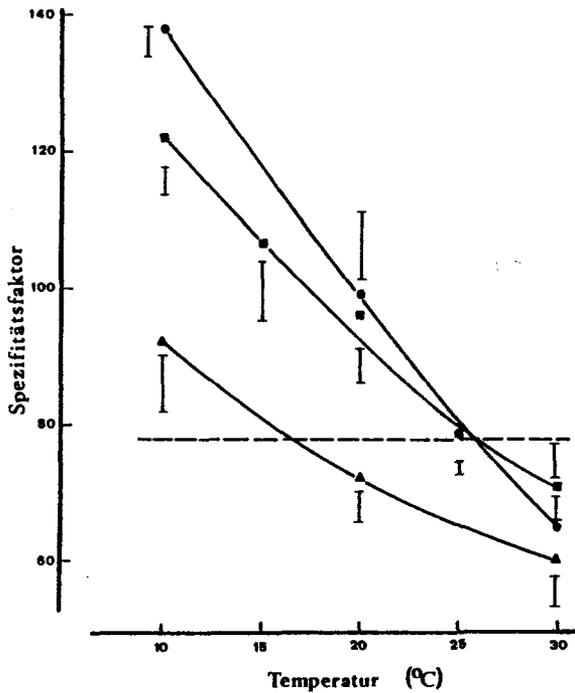
Zur Prüfung der Hypothese, ob die Diskrepanz zwischen den CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifitäten *in vivo* und *in vitro* auf einem CO<sub>2</sub> Konzentrierungsmechanismus beruht, wurden Weisskleepflanzen bei verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen herangezogen. Bei Algen wirkt sich die Anzucht bei niedriger CO<sub>2</sub>-Konzentration auf den CO<sub>2</sub> Konzentrierungsmechanismus aus (Marcus et al., 1982). Zur Beurteilung, ob in den Weisskleebblättern ähnliche Verhältnisse herrschen, wurde deren Gasaustausch nach Anzucht bei verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen untersucht. Dabei wurden sowohl die Verhältnisse von Photorespiration zu Bruttphotosynthese der Blätter nach Anzucht bei 100 Pa p(CO<sub>2</sub>) ermittelt als auch diejenigen der Blätter nach Anzucht bei 20 Pa p(CO<sub>2</sub>). Dazu war die Bruttoaufnahme des interzellulären CO<sub>2</sub> und die Nettophotosynthese bei konstantem p(CO<sub>2</sub>) (30 Pa) und variierten p(O<sub>2</sub>) (2-80 kPa) zu bestimmen. Die Daten sind in der Figur 13 dargestellt. Analog zu den Figuren 8 und 10 entsprechen die reziproken Steigungsmasse der Verbindungslinien wiederum die CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifitäten des Photosyntheseapparates (*in vivo*) oder der RuBPCO (*in vitro*) für die Substrate CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>.

Die Pflanzen, die bei 100 Pa p(CO<sub>2</sub>) gewachsen waren, wiesen einen steileren Kurvenverlauf auf und somit eine kleinere CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität *in vivo* als Pflanzen mit der Wachstumsbedingung von 20 Pa p(CO<sub>2</sub>). Die Gerade der RuBPCO-Aktivität verlief steiler als diejenigen des Gasaustausches. Bei 10°C lag somit die CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität *in vivo* bei beiden Anzuchtsbedingungen über der CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität *in vitro*.

In der Folge wird der Einfluss der CO<sub>2</sub>-Konzentration während der Anzucht auf die CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifität *in vivo* bei verschiedenen Temperaturen untersucht, dann bei verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen und schliesslich bei verschiedenen Lichtintensitäten.

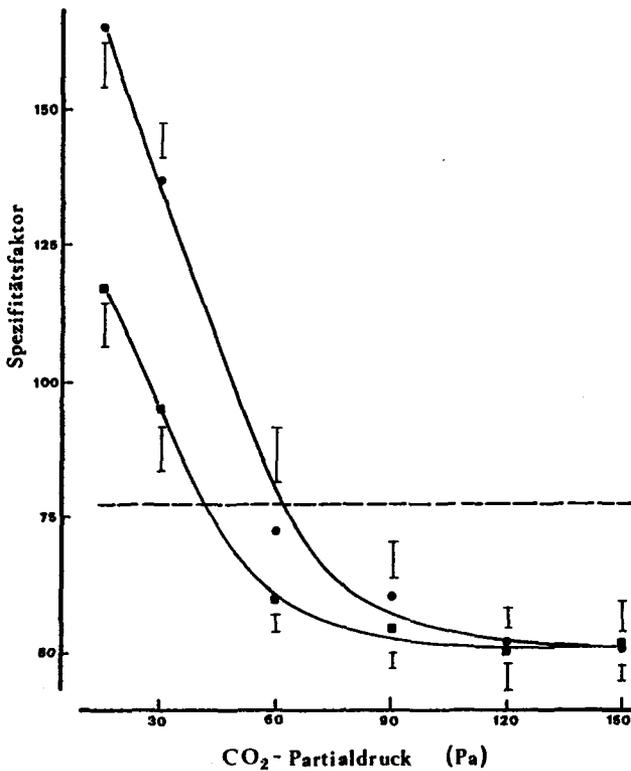


Figur 13: Die Bestimmung der  $CO_2/O_2$ -Spezifität *in vivo* in Abhängigkeit der  $CO_2$  Konzentration und der Anzucht der Blätter. ( $\bullet$ ): Anzucht bei 20 Pa  $p(CO_2)$ , ( $\blacksquare$ ): Anzucht bei 100 Pa  $p(CO_2)$ . Die Temperatur betrug  $10^\circ C$  und die Lichtintensität  $2000 \mu mol$  Quanten  $m^{-2} s^{-1}$ . Der  $CO_2$ -Partialdruck wurde bei 30 Pa konstant gehalten, während der  $O_2$ -Partialdruck von 2-80 kPa variiert wurde. Die Verhältnisse von Photorespiration zu Bruttphotosynthese  $[2(P'-F)/P']$  wurden in Abhängigkeit der Verhältnisse gelöster Konzentrationen von  $O_2$  zu  $CO_2$  aufgetragen, die im Gleichgewicht mit den Partialdrücken des Interzellularraumes standen. Die Kehrwerte der Kurvenneigungen entsprechen den  $CO_2/O_2$ -Spezifitäten *in vitro* (gestrichelte Linie) und *in vivo* (ausgezogene Linien). Die Symbole stellen Mittelwerte aus zwei bis drei Bestimmungen dar.



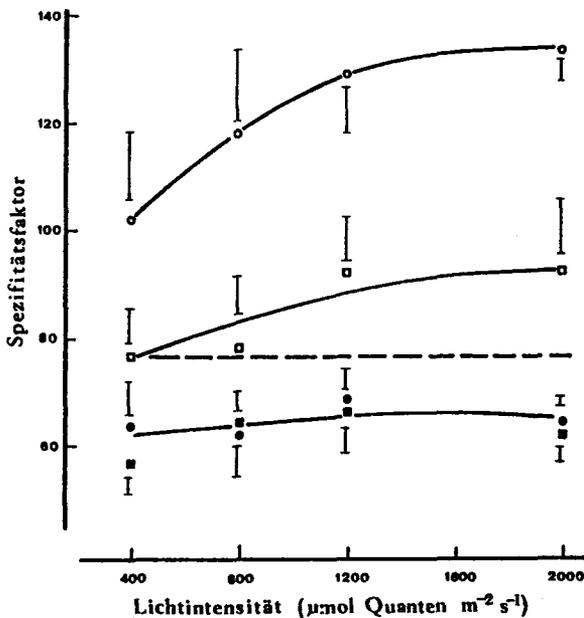
Figur 14: Der Einfluss der Temperatur auf die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität nach der Anzucht der Blätter bei verschiedenen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen. Die gestrichelte Linie bezeichnet die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro* (siehe Figur 11). Die ausgezogenen Linien bezeichnen die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  Spezifitäten *in vivo* nach Anzucht bei 20 Pa (●), 33 Pa (■) und 100 Pa (▲)  $p(\text{CO}_2)$ . Die Gasaustauschmessungen erfolgten bei einer Lichtintensität von  $2000 \mu\text{mol Quanten m}^{-2}\text{s}^{-1}$  und bei 30 Pa  $p(\text{CO}_2)$ . Die senkrechten Balken stellen die mittleren Fehler von zwei bis vier Bestimmungen dar.

In der Figur 14 sind die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifitäten in Abhängigkeit der Temperatur aufgetragen. Bei  $30^\circ\text{C}$  war die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität ziemlich unabhängig von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration, die während des Wachstums geherrscht hatte. Mit sinkender Temperatur stieg sie aber je nach der Anzuchtbedingung unterschiedlich an. Eine Temperatursenkung erhöhte die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* bei Blättern nach Anzucht bei reduziertem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck stärker als nach Anzucht bei erhöhtem  $\text{CO}_2$ -Angebot. Die Blätter, welche bei durchschnittlichem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck (33 Pa) gewachsen waren, wiesen eine mittlere Reaktion auf die Temperaturveränderung auf.



Figur 15: Der Einfluss des interzellulären  $\text{CO}_2$ -Partialdrucks auf die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  Spezifität *in vivo* bei Blättern nach Anzucht bei 20 Pa (●) und bei 100 Pa (■)  $p(\text{CO}_2)$ . Das Verhältnis von  $p(\text{CO}_2)$  zu  $p(\text{O}_2)$  der Umgebungsluft wurde während der Messung konstant gehalten ( $15 \cdot 10^{-4}$ ). Die Temperatur betrug  $10^\circ\text{C}$  und die Lichtintensität  $2000 \mu\text{mol Quanten m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Die vertikalen Balken bezeichnen den mittleren Fehler von zwei bis vier Messungen. Die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro* ist als gestrichelte Linie eingetragen (siehe Figur 10).

Die Figur 15 zeigt die Abhängigkeit der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität vom  $\text{CO}_2$ -Partialdruck bei  $10^\circ\text{C}$ . War der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck während der Messung hoch, so verhielt sich die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* unabhängig von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration, die während der Anzuchtperiode geherrscht hatte. Wurde der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck während der Messung reduziert, so nahm die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* aber unterschiedlich zu. Ihr Anstieg war stärker bei Blättern, denen weniger  $\text{CO}_2$  während des Wachstums zur Verfügung gestanden hatte.



Figur 16: Der Einfluss der Lichtintensität auf die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* bei Pflanzen, die bei 20 Pa  $p(\text{CO}_2)$  (runde Symbole) und bei 100 Pa  $p(\text{CO}_2)$  (quadratische Symbole) gewachsen waren. Die Messtemperatur betrug 10°C (O, □) und 30°C (●, ■). Die gestrichelte Linie bezeichnet die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro*. Die senkrechten Balken stellen die mittleren Fehler von zwei bis vier Messungen dar.

In der Figur 16 wurde die Abhängigkeit der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* von der Lichtintensität bei 10°C und 30°C verglichen. Die Blätter, die bei 20 Pa  $p(\text{CO}_2)$  gewachsen waren, zeigten bei 10°C und bei allen Lichtintensitäten höhere  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifitäten als die Blätter, die bei 100 Pa  $p(\text{CO}_2)$  herangewachsen waren. Bei 30°C war die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität unabhängig von der

Lichtintensität und wurde auch von der  $\text{CO}_2$ -Konzentration während der Anzucht nicht beeinflusst. Sie lag unter dem Wert der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro*.

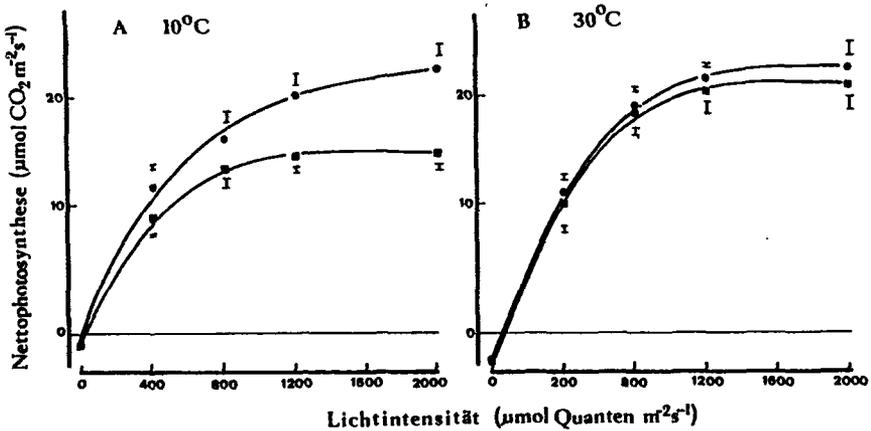
Bei  $10^\circ\text{C}$  war ein leichter Einfluss der Lichtintensität feststellbar, wobei die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität mit zunehmender Einstrahlung anstieg. Vermutlich hängt dies einerseits mit der Dunkelrespiration zusammen, die mit steigender Lichtintensität weniger ins Gewicht fällt.

Der Vergleich des Gasaustausches bei Pflanzen, die unter verschiedenen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen herangewachsen sind, zeigt, dass die Diskrepanz zwischen dem Gasaustausch und der Enzymkinetik nach Anzucht bei niedriger  $\text{CO}_2$ -Konzentration ausgeprägter und die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* höher war. Die Interpretation dieser Diskrepanz als Auswirkung des  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus wird dadurch gestützt.

### 3.2.4 Der Einfluss der CO<sub>2</sub>-Konzentration während der Anzucht auf die Nettophotosynthese

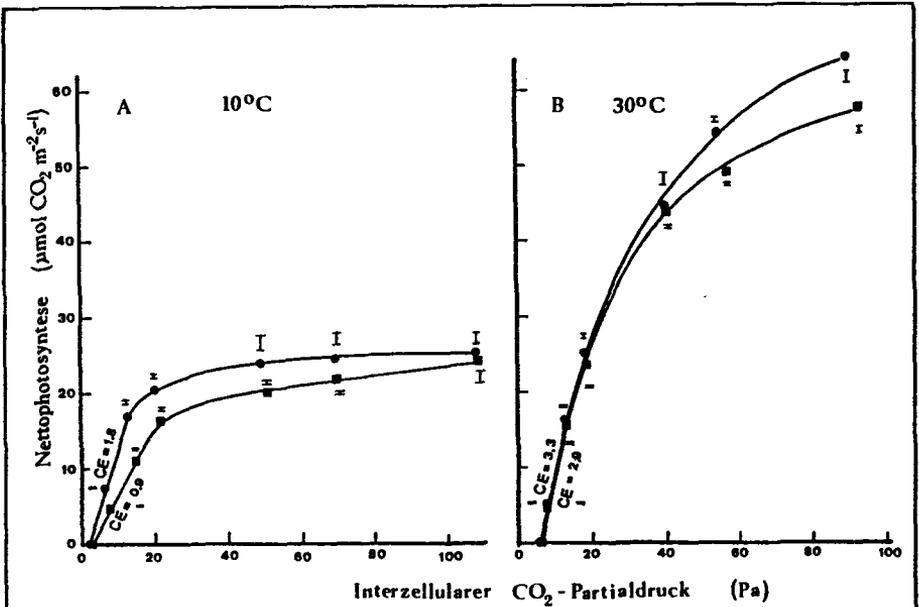
Rückschlüsse auf die Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> am Ort seiner Fixierung lassen sich auch aus Messungen der Nettophotosynthese ziehen. Diese wurde an Blättern nach Anzucht bei erhöhtem beziehungsweise reduziertem CO<sub>2</sub>-Partialdruck in Abhängigkeit der Lichtintensität, der Temperatur und der CO<sub>2</sub>-Konzentration bestimmt.

Die bei 20 Pa p(CO<sub>2</sub>) gewachsenen Weisskleeblätter zeigten bei 10°C eine höhere Photosynthese als die Blätter, die bei 100 Pa p(CO<sub>2</sub>) gewachsen waren. (Figur 17 A). Dieser Unterschied vergrösserte sich noch mit zunehmender Lichtintensität. Bei 30°C unterschieden sich allerdings die Nettophotosyntheseraten der Blätter mit verschiedenen CO<sub>2</sub>-Anzuchtbedingungen kaum mehr (Figur 17 B). Mit veränderter Messtemperatur wandelte sich auch die Kurvenform. Bei 10°C bogen die Photosynthese-Lichtkurven der Blätter aus angereicherter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre stärker ab, als die Kurven der Blätter, die mit verringertem CO<sub>2</sub> herangewachsen waren. Nach dem Modell von Marshall und Biscoe (1980) kann aus dem Kurvenverlauf auf den Faktor ( $\theta$ ) geschlossen werden. Dieser bezeichnet das Verhältnis des CO<sub>2</sub>-Diffusionswiderstandes zum gesamten Widerstand einschliesslich des Widerstandes, der sich der enzymatischen Fixierung entgegenstellt. Bei 10°C war diese Verhältniszahl bei Blättern aus reduzierter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kleiner ( $\theta = 0,3$ ) als bei solchen, die in angereicherter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gewachsen waren ( $\theta = 0,9$ ). Dies wies darauf hin, dass der Diffusionsprozess bei Pflanzen aus reduzierter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre das bedeutend kleinere Hindernis in der CO<sub>2</sub>-Fixierung darstellte als die enzymatische Fixierung. Bei 10°C schien die Fortbewegung des CO<sub>2</sub> aus der Umgebungsluft zum Fixierungsort wesentlich leichter zu sein, falls den Blättern ein reduziertes CO<sub>2</sub>-Angebot während des Wachstums zur Verfügung gestanden hatte. Bei 30°C ( $\theta = 0,9$ ) fiel der Diffusionswiderstand weit stärker ins Gewicht, als das durch die enzymatische Reaktion bedingte Hemmnis der CO<sub>2</sub>-Fixierung.



Figur 17: Die Nettophotosynthese in Abhängigkeit der Lichtintensität bei 10°C (A) und bei 30°C (B). Das Symbol (●) bezeichnet die Nettophotosyntheseraten der Blätter, die bei 20 Pa  $p(\text{CO}_2)$  gewachsen sind, und (■) bezeichnet die Nettophotosynthese der Blätter nach Anzucht bei 100 Pa  $p(\text{CO}_2)$ . Während der Messung betrug  $p(\text{CO}_2)$  der Umgebungsluft 30 Pa und  $p(\text{O}_2)$  20 kPa. Die vertikalen Balken bezeichnen die mittleren Fehler von drei bis fünf Einzelmessungen.

Auch die Abhängigkeit der Nettophotosynthese vom  $\text{CO}_2$ -Partialdruck während der Messung wurde vom  $\text{CO}_2$ -Angebot während der Anzucht beeinflusst. Bei einer Temperatur von 10°C verlief die Photosynthese- $\text{CO}_2$ -Kurve bei den Blättern nach Anzucht bei 20 Pa  $p(\text{CO}_2)$  steiler als bei den Blättern, die bei 100 Pa  $p(\text{CO}_2)$  herangewachsen waren (Figur 18).



Figur 18: Die Nettophotosynthese in Abhängigkeit der  $\text{CO}_2$ -Konzentration bei  $10^\circ\text{C}$  (A) und bei  $30^\circ\text{C}$  (B). Nettophotosyntheseraten nach Anzucht bei  $20 \text{ Pa } p(\text{CO}_2)$  (●) und nach Anzucht bei  $100 \text{ Pa } p(\text{CO}_2)$  (■). Während der Messung betrug die Lichtintensität  $2000 \text{ } \mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , und der  $\text{CO}_2$ -Partialdruck  $30 \text{ Pa}$ . Die vertikalen Balken stellen die mittleren Fehler von drei bis fünf Messungen dar. Die Steigung im linearen Abschnitt der Kurven ist ein Maß der Carboxylierungseffizienz (CE).

Bei  $10^\circ\text{C}$  war somit die Carboxylierungseffizienz, die sich in der Anfangssteigung der Kurve ausdrückte, bei Blättern nach Anzucht bei  $20 \text{ Pa } p(\text{CO}_2)$  höher als bei solchen nach der Anzucht bei  $100 \text{ Pa } p(\text{CO}_2)$  (Figur 18 A). Bei  $30^\circ\text{C}$  war dagegen kein Einfluss der  $\text{CO}_2$ -Konzentration während der Anzucht auf die Carboxylierungseffizienz mehr feststellbar. Beide Kurven zeigten eine ähnliche Anfangssteigung (Figur 18 B). Bei gesättigter  $\text{CO}_2$ -Konzentration lag aber die Photosyntheserate der Blätter nach Anzucht in reduzierter  $\text{CO}_2$ -Konzentration leicht über derjenigen der Blätter nach Anzucht in erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration.

Kriedemann und Wong (1984) untersuchten den Einfluss der  $\text{CO}_2$ -Konzentration während des Wachstums auf die Photosynthese bei verschiedenen Pflanzenarten. Sie fanden, dass die Aenderung der Carboxylierungseffizienz von einer Abnahme der RuBPCO- und Hill-Aktivität ( $\text{O}_2$ -Abgabe aus der Wasserspaltung) begleitet war. Mit diesen beiden Faktoren lässt sich aber der Unterschied zwischen den  $\text{CO}_2$ -abhängigen Photosynthesekurven der Pflanzen nach der Anzucht in erhöhter, respektive in reduzierter  $\text{CO}_2$ -Konzentration nicht vollständig erklären. Der Einfluss der  $\text{CO}_2$ -Konzentration während der Anzucht machte sich nur bei tiefen Temperaturen bemerkbar. So drängt sich die Suche nach weiteren Faktoren auf, die zur Erklärung der veränderten Photosyntheseleistung beitragen, und die unabhängig sowohl von der RuBP-CO-Aktivität als auch von der Hill-Aktivität (welche die RuBP-Regeneration ermöglicht) sind. Ein Faktor könnte dabei die veränderte Aktivität der Carboanhydrase sein. Als Teil des  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus spielt die Carboanhydrase - wie an Algen gezeigt worden ist - eine sehr wichtige Rolle.

Aus dem Verlauf der Lichtintensitäts- und der  $\text{CO}_2$ -Konzentrationskurven der Nettophotosynthese können somit weitere Anhaltspunkte dafür gewonnen werden, dass diejenigen Blätter  $\text{CO}_2$  leichter an den Fixierungsort befördern, die bei erniedrigter  $\text{CO}_2$ -Konzentration herangewachsen sind.

## Kapitel IV

### SCHLUSSDISKUSSION

Bei der Photosynthese wird  $\text{CO}_2$  mit Hilfe von Lichtenergie in Zucker gebunden. Dabei katalysiert die Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (RuBPCO) sowohl die Aufnahme von  $\text{CO}_2$  bei der Photosynthese als auch die Fixierung von  $\text{O}_2$  bei der Photorespiration. Im Laufe der Photorespiration wird  $\text{CO}_2$  auch wieder freigesetzt. Durch die komplizierten Verhältnisse der Fixierung, Freisetzung und Refixierung von  $\text{CO}_2$  durch die Prozesse der Photosynthese und der Photorespiration sind die tatsächlichen Fixierungsraten schwierig zu bestimmen. Es steht aber fest, dass die Photorespiration und Photosynthese durch die Oxygenierung und Carboxylierung von RuBP bedingt sind und durch das Angebot von  $\text{O}_2$  und  $\text{CO}_2$  im Chloroplasten beeinflusst werden.

Damit  $\text{CO}_2$  in die Chloroplasten gelangt, muss es die Spaltöffnungen, Interzellularräume, Zellwände, Plasmalemmas, Cytoplasmen und Chloroplastenhüllen durchqueren. Die  $\text{CO}_2$ -Konzentration in der Luft ist sehr gering und kann im Blatt durch die Photosynthese und die Photorespiration verändert werden. Allgemein wird angenommen, dass  $\text{CO}_2$  aufgrund eines Gradienten von der Umgebungsluft in die Chloroplasten des Blattes hineindiffundiert. In höheren  $\text{C}_3$ -Pflanzen, wie hier am Beispiel von Weissklee gezeigt werden konnte, scheint offenbar anorganischer Kohlenstoff auch aktiv aufgenommen zu werden. Dabei übernimmt vermutlich Bicarbonat die Funktion eines  $\text{CO}_2$ -'Carriers'. Ein bekannter Fall der  $\text{CO}_2$ -Konzentrierung spielt sich in  $\text{C}_4$ - und CAM-Pflanzen ab. Hier tritt eine organische Verbindung, Malat oder Aspartat, als  $\text{CO}_2$ -'Carrier' auf. Dieses Photosynthesystem ist allerdings energiebedürftiger als dasjenige der  $\text{C}_3$ -Pflanzen; es ist aber bei hohen Lichtintensitäten und Temperaturen infolge fehlender Verluste durch die Photorespiration effizienter. Andererseits vermögen Algen und Wasserpflanzen als  $\text{C}_3$ -Pflanzen anorganischen Kohlenstoff in Form von Bicarbonat aktiv in die Zellen aufzunehmen. Möglicherweise erfolgt ein ähnlicher Prozess auch in den Mesophyllzellen der  $\text{C}_4$ - oder CAM-Pflanzen, indem Bicarbonat aktiv aufgenom-

men wird und als Substrat der Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat zur Verfügung steht. Damit würde der aktive CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus auch bei der intermediären CO<sub>2</sub>-Fixierung von Bedeutung sein.

Die Frage, ob bei der Photosynthese in höheren C<sub>3</sub>-Pflanzen auch eine CO<sub>2</sub>-Konzentrierung stattfindet, kann hier zwar nicht umfänglich beantwortet werden, aber es lassen sich aus dem Vergleich der Enzymkinetik mit dem Gasaustausch bei Weissklee klare Hinweise dazu finden. Nach dem Modell von Mächler et al. (1985) kann nämlich die Verfügbarkeit des Substrates CO<sub>2</sub> im Chloroplasten anhand der CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Spezifitäten sowohl des Enzyms *in vitro* als auch des Gasaustausches *in vivo* beurteilt und daraus auf die Art und Weise des Zutritts von CO<sub>2</sub> ins Stroma geschlossen werden:

$$S \text{ in vivo} = S \text{ in vitro} \cdot f \cdot k_{11}/k_{1-1} \quad (19);$$

wobei  $k_{11}$  die Leitfähigkeit für CO<sub>2</sub> vom Interzellularraum ins Cytoplasma darstellt und  $k_{1-1}$  dieselbe in umgekehrter Richtung, d.h. vom Cytoplasma in den Interzellularraum. Der Faktor  $f$  bezeichnet das Verhältnis der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Chloroplastenstroma ( $C_g$ ) zu derjenigen im Cytoplasma ( $C_c$ ) (siehe Figur 3, Einleitung).

Wenn das Verhältnis von  $S \text{ in vivo}$  zu  $S \text{ in vitro}$  kleiner als eins ist, dann erfolgt die Translokation des CO<sub>2</sub> von der Umgebungsluft zum Chloroplasten durch Diffusion aufgrund eines Konzentrationsgradienten ( $f \cdot k_{11}/k_{1-1} < 1$ ).

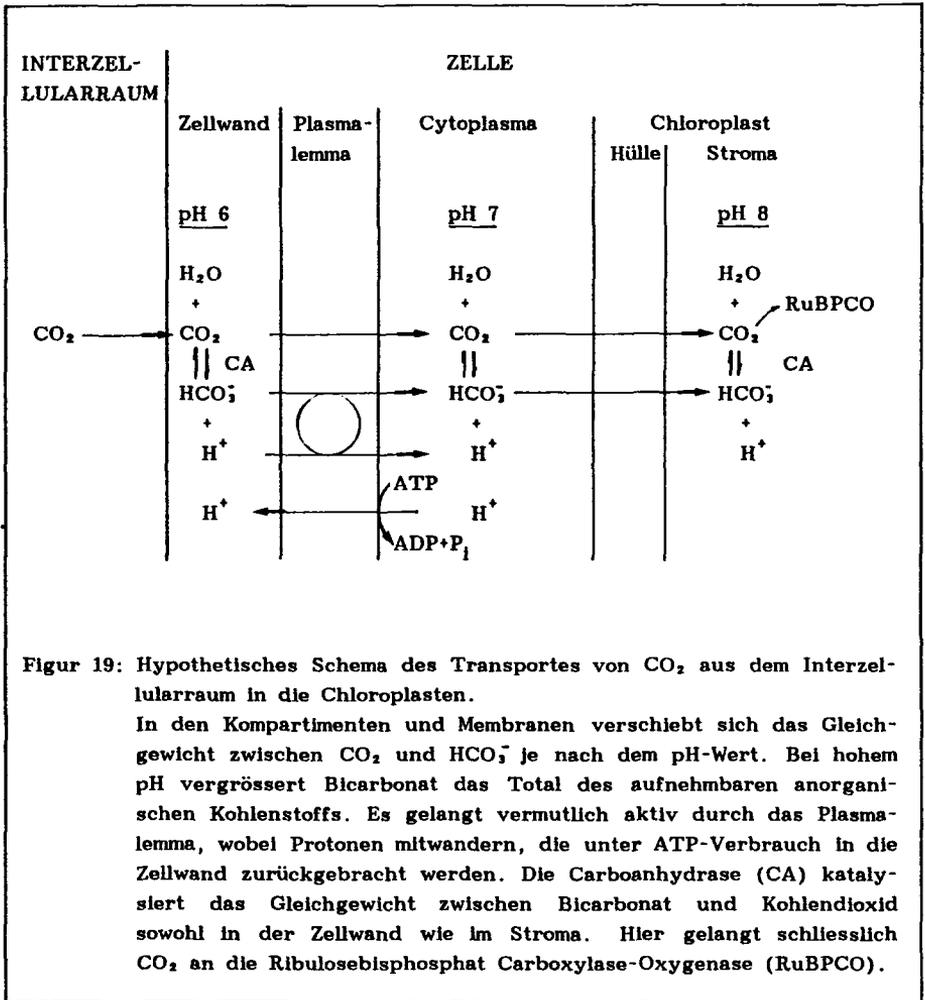
Wenn aber das Verhältnis von  $S \text{ in vivo}$  zu  $S \text{ in vitro}$  grösser als eins ist, dann kann ein aktiver CO<sub>2</sub>-Konzentrierungsmechanismus vermutet werden, der im Plasmalemma (falls:  $k_{11}/k_{1-1} > 1$ ) oder in der Chloroplastenhülle (falls:  $f > 1$ ) lokalisiert sein dürfte.

Die Daten zeigten, dass das Verhältnis von  $S \text{ in vivo}$  zu  $S \text{ in vitro}$  sowohl bei hoher Temperatur als auch bei erhöhter CO<sub>2</sub>-Konzentration generell kleiner als eins war, und dass unter diesen Bedingungen kein aktiver Transport nachgewiesen werden konnte. Hingegen lag das Verhältnis von  $S \text{ in vivo}$  zu  $S \text{ in vitro}$  über eins, wenn die Temperatur und die CO<sub>2</sub>-Konzentration niedrig waren. Dieses Verhältnis entspricht einem hypothetischen CO<sub>2</sub>-Konzentrierungskoeffizienten, der bei 10°C und 30 Pa  $p(\text{CO}_2)$  bei 1,6 lag und mit steigender Temperatur abnahm.

Der postulierte  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus scheint folglich mit steigenden Temperaturen und zunehmender  $\text{CO}_2$ -Konzentration an Wirkung einzubüßen. Dies lässt sich damit erklären, dass ein aufgebauter  $\text{CO}_2$ -Gradient an einer Membran bei steigender Temperatur vermutlich infolge zunehmender Permeabilität wieder verloren geht. Der  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus folgt wahrscheinlich einer Sättigungskinetik, so dass seine Wirksamkeit nur bei geringer, durchschnittlicher  $\text{CO}_2$ -Konzentration in der Aussenluft sichtbar wird.

Aus den Experimenten mit Algen ist bekannt, dass der  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus in Pflanzen nach ihrer Anzucht bei tiefer  $\text{CO}_2$ -Konzentration viel effizienter ist als nach Anzucht bei erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration (Hogetsu und Miyachi, 1979; Badger und Andrews, 1982). Der vermutete  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus bei Weissklee verhielt sich diesbezüglich gleich wie bei den Algen: Bei Messtemperaturen von  $10^\circ\text{C}$  bis  $20^\circ\text{C}$  zeigten die Blätter nach Anzucht bei niedriger  $\text{CO}_2$ -Konzentration ein grösseres Verhältnis von  $S$  *in vivo* zu  $S$  *in vitro* als nach Anzucht bei erhöhter  $\text{CO}_2$ -Konzentration. Ein Unterschied war jedoch während der Messung bei hoher Temperatur und hoher  $\text{CO}_2$ -Konzentration nicht mehr erkennbar. Das Verhältnis von  $S$  *in vivo* zu  $S$  *in vitro* lag dann unter eins. Die Ergebnisse belegen damit, dass die  $\text{CO}_2$ -Zufuhr bei der Photosynthese der  $\text{C}_3$ -Pflanzen nicht nur durch Diffusion sondern auch aktiv erfolgen kann.

Ein aktiver Transport würde die Beförderung ionisierter Teilchen, wahrscheinlich  $\text{HCO}_3^-$ , gegen einen elektrochemischen Potentialgradienten bedeuten. Anhand der Abweichung der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* von derjenigen *in vitro* kann vermutet werden, dass der  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus ein aktiver Transportvorgang ist. Die beobachtete Lichtabhängigkeit der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  Spezifität *in vivo*, die sich zwar nur in geringem Masse äusserte, könnte auch darauf hinweisen, dass der  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus durch ATP limitiert wird. ATP wird vermutlich beim Transport von Bicarbonat durch das Plasmalemma benötigt. Im Symport mit Protonen dürfte Bicarbonat ins Cytoplasma gelangen, wo sich ein Gleichgewicht mit  $\text{CO}_2$  einstellt (Figur 19).



Figur 19: Hypothetisches Schema des Transportes von CO<sub>2</sub> aus dem Interzellularraum in die Chloroplasten.

In den Kompartimenten und Membranen verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen CO<sub>2</sub> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> je nach dem pH-Wert. Bei hohem pH vergrößert Bicarbonat das Total des aufnehmbaren anorganischen Kohlenstoffs. Es gelangt vermutlich aktiv durch das Plasmalemma, wobei Protonen mitwandern, die unter ATP-Verbrauch in die Zellwand zurückgebracht werden. Die Carboanhydrase (CA) katalysiert das Gleichgewicht zwischen Bicarbonat und Kohlendioxid sowohl in der Zellwand wie im Stroma. Hier gelangt schliesslich CO<sub>2</sub> an die Ribulosebiphosphat Carboxylase-Oxygenase (RuBPCO).

Die gesamte anorganische Kohlenstoffkonzentration im Cytoplasma wird vermutlich durch das Hineinpumpen von Bicarbonat erhöht. Entlang eines Gradienten gelangt CO<sub>2</sub> aus dem Cytoplasma durch die Chloroplastenhülle ins

Stroma. In diesem alkalischen Milieu liegt das Gleichgewicht zwischen  $\text{CO}_2$  und  $\text{HCO}_3^-$  gänzlich auf Seiten des Bicarbonats. Infolge des pH-Wertes von 8 ist die maximal aufnehmbare Menge an anorganischem Kohlenstoff wesentlich erhöht. Der durch das Licht induzierte pH-Anstieg des Stromas ermöglicht somit nicht nur die Aktivierung von RuBPCO, sondern auch gleichzeitig die Auffüllung eines anorganischen Kohlenstoffspeichers in Form von Bicarbonat. Die Carboanhydrase katalysiert dabei die Nachlieferung von  $\text{CO}_2$  aus dem Bicarbonat an die RuBPCO. Möglicherweise erleichtert die Carboanhydrase auch noch den Durchtritt von  $\text{CO}_2$  durch die Chloroplastenhülle (Lucas, 1983).

Ein photosynthetisch aktiver Organismus, der sowohl  $\text{CO}_2$  als auch  $\text{HCO}_3^-$  aufnehmen kann, hat eine breitere Ernährungsbasis und ist damit konkurrenzkräftiger. Badger, Kaplan und Berry (1980) zeigten, dass im Cytoplasma von Cyanobakterien anorganischer Kohlenstoff auf das Vielfache der Aussenkonzentration angehäuft wird. Aus dem anorganischen Kohlenstoffvorrat der Zelle kann der Photosyntheseyklus vermehrt mit Substrat beliefert werden. Die ökologische Bedeutung eines aktiven anorganischen Kohlenstofftransports leuchtet gerade bei den  $\text{C}_3$ -Pflanzen ein. Viele dieser Pflanzen sind in kühl-gemäßigten Klimaten behelmatet und weisen somit ein tieferes Temperaturoptimum auf als  $\text{C}_4$ -Pflanzen (z.B. Mais). Der bei niedriger Temperatur besonders effiziente  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus könnte erklären, warum  $\text{C}_3$ -Pflanzen bei kühlen Temperaturen eine überraschend hohe Photosyntheserate aufweisen.

Die Effizienz einer aktiven Beförderung von anorganischem Kohlenstoff könnte auch als Selektionskriterium bei der Züchtung von Kulturpflanzen verwendet werden. Eine vermehrte  $\text{CO}_2$ -Aufnahme vergrößert die Photosynthese und reduziert den durch die Photorespiration bedingten Abbau von Kohlenhydraten und Energiebedarf. Die züchterische Bearbeitung des  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus könnte aber auch den Versuch überflüssig machen, die Oxygenasefunktion der RuBPCO auszuschalten, oder in den Photorespirationszyklus einzugreifen. Der Glycolatweg ist nämlich sowohl für die  $\text{C}_4$ - wie  $\text{C}_3$ -Pflanzen von physiologischer Bedeutung, indem er beispielsweise den Photosyntheseapparat bei hohem Lichteinfall und geringem  $\text{CO}_2$ -Angebot vor Lichthemmung schützt und gleichzeitig Glycin und Serin bereitstellt.

Der  $\text{CO}_2$ -Konzentrationsmechanismus wirkt sich in  $\text{C}_3$ -Pflanzen offenbar bei niedrigen Temperaturen stärker aus. Er könnte indirekt die Ausbildung einer Kältetoleranz in photosynthetisch aktiven Geweben ermöglichen. Bedingt durch die erhöhte  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentration im Cytoplasma, können vermehrt Malat und Zucker gebildet werden. Diese werden infolge verringerter Meristemaktivität bei tiefen Temperaturen nicht sofort benötigt und erhöhen den osmotischen Wert des Zellsaftes. Damit dürfte der erhöhte Gehalt an Malat und Zucker zu einer grösseren Kältetoleranz der Blätter führen.

Der vermutlich an Membranen aktive  $\text{CO}_2$ -Konzentrationsmechanismus wird möglicherweise durch Schadstoffe der Umgebung inaktiviert. Unsere Kulturpflanzen und Waldbäume ( $\text{C}_3$ -Pflanzen) sind von der Umweltverschmutzung betroffen. Der Verlust der aktiven  $\text{CO}_2$ -Zufuhr könnte die Photosynthese als Grundlage des Metabolismus beeinträchtigen und die Pflanzen in ihrer Vitalität schwächen.

## Kapitel V

### ZUSAMMENFASSUNG

Die Eigenschaften des Gasaustausches intakter Weisskleeblätter wurden mit der Enzymkinetik von Ribulosebisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (RuBPCO) verglichen, um Näheres über das Verhältnis der Substratkonzentrationen von  $\text{CO}_2$  und  $\text{O}_2$  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  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität ( $V_c/K_c \cdot K_o/V_o = v_c/v_o \cdot O/C$ ) praktisch temperaturunabhängig war: Die Aktivierungsenergie der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  Spezifität *in vitro* betrug zwischen  $10^\circ\text{C}$  und  $25^\circ\text{C}$  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  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen dem Verhältnis der Carboxylierung zur Oxygenierung gegenübergestellt werden. Bei  $25^\circ\text{C}$  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  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro* charakterisierte Kinetik von RuBPCO deckte sich also bei tiefen Temperaturen nicht mehr mit der  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität des Gasaustausches *in vivo*. Bei  $30 \text{ Pa } p(\text{CO}_2)$  in der Umgebungsluft betrug die  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vivo* bei  $10^\circ\text{C}$  123, bei  $20^\circ\text{C}$  98 und bei  $30^\circ\text{C}$  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  $\text{CO}_2$ -Partialdruck, und umgekehrt verkleinerte sie sich mit zunehmendem  $\text{CO}_2$ -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  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität *in vitro* und *in vivo* gründet folglich auf einer Unterschätzung der  $\text{CO}_2$ -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  $\text{CO}_2$ -Konzentrierungsmechanismus bei tiefen Temperaturen und geringem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck eine erhöhte  $\text{CO}_2$ -Konzentration in den Chloroplasten bewirkt.

Bei Algen erhöht ein Absenken der  $\text{CO}_2$ -Konzentration die Effizienz des postulierten  $\text{CO}_2$ -Konzentrationsmechanismus. Auch die Weisskleeblätter nach Anzucht bei geringem  $\text{CO}_2$ -Partialdruck (20 Pa) wiesen eine höhere  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ -Spezifität des Gaswechsels *in vivo* auf als die Blätter nach Anzucht bei 100 Pa  $p(\text{CO}_2)$ . Offenbar verfügen Weisskleeblätter über einen ähnlichen  $\text{CO}_2$ -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 CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup>; whereas it was 85.6 kJ mol<sup>-1</sup> for the maximum rate of carboxylation ( $V_c$ ) and 39.1 kJ mol<sup>-1</sup> 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 CO<sub>2</sub> measured by infrared gas analysis as well as by gross uptake measured by short time exposure to <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. The ratio of photosynthesis to photorespiration *in vivo* was compared with the ratio of carboxylation to oxygenation *in vitro* at different temperatures and CO<sub>2</sub> concentrations. These ratios were in agreement at 25°C and at 30 Pa p(CO<sub>2</sub>) 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 CO<sub>2</sub> partial pressure was

decreased. On the other hand, a decrease was found when the  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$  concentrating mechanism which raised the  $\text{CO}_2$  concentration in the chloroplasts at low temperature and low  $\text{CO}_2$  partial pressure.

In algae, a decrease in  $\text{CO}_2$  concentration raises the efficiency of the postulated  $\text{CO}_2$  concentrating mechanism. Similarly, leaves of white clover plants grown at low  $\text{CO}_2$  partial pressure (20 Pa) showed a higher specificity factor *in vivo* than leaves grown at 100 Pa  $p(\text{CO}_2)$ . Obviously, a  $\text{CO}_2$  concentrating mechanism similar to that which has been found in aquatic plants must have affected the  $\text{CO}_2$  concentration in white clover leaves at low temperatures.

## Kapitel VII

### LITERATUR

- Azcon-Bieto, J., Farquhar, G.D., und Caballero, A., 1981. Effects of temperature, oxygen concentration, leaf age and seasonal variations on the CO<sub>2</sub> compensation point of *Lolium perenne* L. *Planta*, 154, 497 - 504.
- Badger, M.R., und Lorimer, G.H., 1976. Activation of ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase. The role of M<sup>2+</sup>, CO<sub>2</sub> and pH. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 175, 723-729.
- Badger, M.R., und Collatz, G.J., 1977. Studies on the kinetic mechanism of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and oxygenase reactions, with particular reference to the effect of temperature on kinetic parameters. *Carnegie Institution of Washington, Yearbook* 76, 355 - 361.
- Badger, M.R., Kaplan, A., und Berry, J.A., 1980 Internal inorganic carbon pool of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 66, 407 - 504.
- Badger, M.R., und Andrews, T.J., 1982. Photosynthesis and inorganic carbon usage by the marine cyanobactereium *Synechococcus* sp. *Plant Physiology*, 70, 517 - 523.
- Bensadoun, A., und Weinstein, D., 1976. Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry*, 70, 241 - 250.
- Boller, B.C., 1980. Bestandesphotosynthese und Assimilatverteilung bei Oekotypen von Weissklee (*Trifolium repens* L.) unter verschiedenen Temperaturen und Tageslängen. *Dissertation ETH-Zürich*, 6564, 3 - 4.
- Čatský, J., 1971. General principles of using IRGA for measuring CO<sub>2</sub> exchange rates. In: *Plant photosynthetic production. Manual of methods*. 162 - 166. Z. Šesták, J., Čatský, und P.G. Jarvis (Eds.). Dr. W. Junk N.V. Publishers, The Hague.
- Coleman, J.R., Berry, J.A., Togasaki, R.K., und Grossman, A.R., 1984. Identification of extracellular carbonic anhydrase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 76, 472 - 477.

- Espie, G.S., und Colman, B., 1982. Photosynthesis and inorganic carbon transport in isolated *Asparagus mesophyll* cells. *Plant Physiology*, 70, 649 - 654.
- Farquhar, G.D., von Caemmerer, S., und Berry, J.A., 1980. A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub>-species. *Planta*, 149, 78 - 90.
- Fock, H., Klug, K., und Calvin, D.T., 1979. Effect of carbon dioxide and temperature on photosynthetic CO<sub>2</sub> uptake and photorespiratory CO<sub>2</sub> evolution in sunflower leaves. *Planta*, 145, 219 - 223.
- Forrester, M.L., Krotkov, G., und Nelson, C.D., 1966. Effect of oxygen on photosynthesis, photorespiration and respiration in detached leaves. I. Soybean. *Plant Physiology*, 41, 422 - 427.
- Hall, N.P., und Keys, A.J., 1983. Temperature dependence of the enzymic carboxylation and oxygenation of ribulose-1,5-bisphosphate in relation to effects of temperature on photosynthesis. *Plant Physiology*, 72, 945 - 948.
- Harned, H.S. und Bonner, F.T., 1945. The first ionisation of carbonic acid in aqueous solutions of sodium chloride. *Journal of the American Chemical Society*, 67, 1026 - 1031.
- Hogetsu, D., und Miyachi, S., 1979. Role of carbonic anhydrase in photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation in *Chlorella*. *Plant and Cell Physiology*, 20, 747-756.
- Jarvis, P.G., 1971. The estimation of resistances to carbon dioxide transfer. In: *Plant photosynthetic production. Manual of methods*. 566 - 631. Z. Šesták, J. Čatský, und P.G. Jarvis (Eds.). Dr. W. Junk N.V. Publishers, The Hague.
- Jolliffe, P.A., und Tregunna, E.B., 1968. Effect of temperature, CO<sub>2</sub> concentration, and light intensity on oxygen inhibition of photosynthesis in wheat leaves. *Plant Physiology*, 43, 902 - 906.
- Jordan, D.B., und Ogren, W.L., 1981. A sensitive assay procedure for simultaneous determination of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and oxygenase activities. *Plant Physiology*, 67, 237 - 245.
- Jordan, D.B., und Ogren, W.L., 1983. Species variation in kinetic properties of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 227, 425 - 433.
- Jordan, D.B., und Ogren, W.L., 1984. The CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Dependence on ribulosebisphosphate concentration, pH and temperature. *Planta*, 161, 308-313.

- Kriedemann, P.E., und Wong, S.C., 1983. Growth response and photosynthetic adaptation to carbon dioxide: Comparative behaviour in some  $C_3$ -species. In: *Advances in Photosynthesis Research Vol. IV*. 209-212. C. Sybesma (Ed.). Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague/Boston/Lancaster.
- Ku, S.B., und Edwards, G.E., 1977a. Oxygen inhibition of photosynthesis. I. Temperature dependence and relation to  $O_2/CO_2$  solubility ratio. *Plant Physiology*, 59, 986 - 990.
- Ku, S.B., und Edwards, G.E., 1977b. Oxygen inhibition of photosynthesis. II. Kinetic characteristics as affected by temperature. *Plant Physiology*, 59, 991 - 999.
- Laing, W.A., Ogren, W.L., und Hageman, R.H., 1974. Regulation of soybean net photosynthetic  $CO_2$  fixation by the interaction of  $CO_2$ ,  $O_2$  and ribulose-1,5-diphosphate carboxylase. *Plant Physiology*, 54, 678 - 685.
- Lange, 1979. *Handbook of Chemistry*. J.A. Dean (Ed.). McGraw-Hill Book Company, New York.
- Lehnherr, B., Mächler, F., und Nösberger, J., 1985. Influence of temperature on the ratio of ribulose biphosphate carboxylase to oxygenase activities and on the ratio of photosynthesis to photorespiration of leaves. *Journal of Experimental Botany*, 36, 1117 - 1125.
- Lorimer, G.H., Badger, M.R., und Andrews, T.J., 1977. D-Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase. Improved methods for the activation and assay of catalytic activities. *Analytical Biochemistry*, 78, 66 - 75.
- Lucas, W.J., 1983. Photosynthetic assimilation of exogenous  $HCO_3^-$  by aquatic plants. *Annual Revue of Plant Physiology*, 34, 71 - 104.
- Ludwig, L.J., und Canvin, D.T., 1970. Gas-exchange system for simultaneous measurement of the  $CO_2$  and  $^{14}CO_2$  fluxes from leaves. *Canadian Journal of Botany*, 49, 1299 - 1313.
- Mächler, F., Keys, A.J., und Cornelius, M.J., 1980. Activation of ribulose biphosphate carboxylase purified from wheat leaves. *Journal of Experimental Botany*, 31, 7 - 14.
- Mächler, F., und Nösberger, J., 1984. Influence of inorganic phosphate on photosynthesis of wheat chloroplasts. II. RuBPCO activity. *Journal of Experimental Botany*, 35, 488 - 494.
- Mächler, F., Lehnherr, B., Schnyder, H., und Nösberger, J., 1985. A  $CO_2$  concentrating system in leaves of higher  $C_3$ -plants predicted by a model based on RuBP carboxylase-oxygenase kinetics and  $^{14}CO_2/^{12}CO_2$  exchange. *Journal of Experimental Botany*, 36, 1542 - 1550.

- Marcus, Y., Zenvirth, D., Harel, E., und Kaplan, A., 1982. Induction of  $\text{HCO}_3^-$  transporting capability and high photosynthetic affinity to inorganic carbon by low concentration of  $\text{CO}_2$  in *Anabaena variabilis*. *Plant Physiology*, 69, 1008 - 1012.
- Marshall, B., und Biscoe, P.V., 1980. A model for  $\text{C}_3$  leaves describing the dependence of net photosynthesis on irradiance. I Derivation. *Journal of Experimental Botany*, 31, 29 - 39.
- O'Leary, M.H., 1981. Carbon isotope fractionation in plants, review. *Phytochemistry*, 20, 553 - 567.
- Spalding, M.H., und Ogren, W.L., 1982. Photosynthesis is required for induction of the  $\text{CO}_2$ -concentrating system in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters*, 145, 41 - 44.
- Tsuzuki, M., und Miyachi, S., 1979. Effects of  $\text{CO}_2$  concentration during growth and of ethoxzolamide on  $\text{CO}_2$  compensation point in *Chlorella*. *FEBS Letters*, 103, 221 - 223.
- Volokita, M., Kaplan, A., und Reinhold, L., 1981. Evidence for mediated  $\text{HCO}_3^-$  transport in isolated pea mesophyll protoplasts. *Plant Physiology*, 67, 1119 - 1123.
- Volokita, M., Zenvirth, D., Kaplan, A., und Reinhold, L., 1984. Nature of the inorganic carbon species actively taken up by the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Plant Physiology*, 76, 599 - 602.
- Wilkinson, G.N., 1961. Statistical estimation in enzyme kinetics. *Biochemical Journal*, 80, 324 - 332.

## Anhang A

### VERDANKUNGEN

Im Januar 1981 wurde ich in die Gruppe von Herrn Professor Nösberger am Institut für Pflanzenbau der ETH Zürich aufgenommen und stieg in das Forschungsgebiet der Ertragsphysiologie ein. Daneben kümmerte ich mich noch während drei Jahren um die Belange des Praktikantendienstes der Abteilung Landwirtschaft der ETH. Dank der Unterstützung meiner Frau und meiner Kollegen konnte ich diese Doppelbelastung meistern.

Mein Dank geht zuerst an Herrn Prof. Nösberger, der ein offenes Ohr hatte für die alltäglichen Sorgen, und an Herrn Prof. Matile, der freundlicherweise das Korreferat übernahm. Beide begeisterten mich schon als Studenten für die geheimnisvolle Welt der Pflanzen, die ich nun im Rahmen dieser Arbeit weiter ergründen konnte.

Felix Mächler half mir viel dabei, nicht nur in versuchstechnischen Fragen durch seine grosse Erfahrung, sondern auch in menschlicher Hinsicht durch seine Geduld und Beharrlichkeit, den wesentlichen Fragen nachzugehen. In gemeinsamen Diskussionen wurden die Grundpfeiler dieser Arbeit gelegt. Zusammen mit Hans Schnyder half er mir in kameradschaftlicher Weise, den Einstieg in die Photosyntheseforschung zu finden. Ihm möchte ich ganz besonders danken.

Der gute Geist, der in der Gruppe herrschte, liess die Mühen bei den Experimenten vergessen. Deshalb danke ich allen Kollegen, die zur guten Stimmung beitrugen. Meine Frau und die beiden Kinder halfen mir auch, den nötigen Abstand und Ausgleich zur Arbeit zu finden.

Allen, die mir während meiner Assistenzzeit geholfen haben, danke ich recht herzlich.

Zürich, im Herbst 1985

## **Anhang B**

### **LEBENS LAUF**

- 1950, 18. Januar** geboren in Spiez als Sohn des Albert Lehnherr  
und der Berta, geb. Kuhn
- 1957-1966** Primar- und Sekundarschule in Spiez
- 1966-1969** Gymnasium Interlaken mit Maturitätsabschluss, Typus C
- 1969-1974** Studium an der Lehramtsschule der Universität Bern  
Patentierung als Sekundarlehrer phil. hist.
- 1974-1978** Studium an der Abteilung Landwirtschaft an der ETH Zürich  
Diplom als Ing. agr. ETH, Fachrichtung Pflanzenbau
- 1979-1980** Auslandsaufenthalt in Uppsala am Institut für Pflanzenbau,  
Universität der Agrarwissenschaften, Schweden
- 1980** Heirat mit Ursula Briggen
- 1980-1983** Praxisberater der Abteilung Landwirtschaft der ETH
- seit 1981** Assistent und wissenschaftlicher Mitarbeiter am  
Institut für Pflanzenbau der ETH
- 1982** Geburt von Reto
- 1985** Geburt von Karin