

Pflanzenphysiologische Übungen WS 2007/08

Kursprotokoll



Peter Anegg, Markus Nolf, Jürgen Schneider

Inhalt:

Messung der Temperaturabhängigkeit der PS-II Aktivität über Chlorophyll-Fluoreszenz	Seite 3
Nachweis von Katalasen, Peroxidasen und Phenolasen.....	Seite 6
a) Katalasen.....	Seite 6
b) Meerrettich-Peroxidase.....	Seite 7
c) Phenolasen	Seite 8
Die enzymatische Bestimmung von Ethanol mit dem optischen Test: Aktivität der Alkoholdehydrogenase (ADH).....	Seite 9
DPPH-Test zur Bestimmung von Gesamtantioxidantien z.B. in Lebensmitteln.....	Seite 13
Trennung und Charakterisierung von Pigmenten der Chloroplasten	Seite 17
Messung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion an isolierten Chloroplasten	Seite 22
Förderung und Hemmung der Abszission durch Phytohormone	Seite 27
a) Etephon	Seite 27
b) IES	Seite 28
c) Resultate der anderen Gruppen	Seite 30
α -Naphtylessigsäure (Gruppe B).....	Seite 30
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (Gruppe C)	Seite 31
Wirkung von Gibberellinen auf das Wachstum des Hypocotyls (Gruppe C)	Seite 32

Messung der Temperaturabhängigkeit der PS-II Aktivität über Chlorophyll-Fluoreszenz

Einleitung

Die Chlorophyllfluoreszenz eignet sich sehr gut, um Informationen über die Qualität des Photosystems II zu gewinnen, ohne der untersuchten Pflanze bzw. den untersuchten Blättern zu schaden.

Werden Blätter nach längerer Dunkelphase mit Licht bestrahlt, ergeben sich innerhalb der ersten Millisekunden verschiedene Absorptionsraten bzw. Fluoreszenzwerte, mit deren Hilfe man die Abfolge und Ausbeute der ersten Primärreaktionen nachvollziehen kann. Konkret handelt es sich um Phasen, in denen die verschiedenen photochemischen Reaktionszentren der Reihe nach aktiviert werden.

Licht, das nicht für die Photosynthese verwendet werden kann, wird dabei in Form von Fluoreszenz wieder abgestrahlt, und die Messung dieser Fluoreszenz gibt daher direkt Aufschluss über den Gesundheitszustand des untersuchten Blattes.

Material und Methoden

- 25 Blätter von Jungpflanzen der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*)
- 25 Blattclips für standardisierte Fluoreszenzmessung
- Fluoreszenz-Messgerät

Je 5 Blätter wurden in schwarzen Plastiksäcken für 80 Minuten bei verschiedenen Temperaturen (siehe Tab. 1), und anschließend noch einmal 30 Minuten bei Raumtemperatur (23 °C) – um pflanzeigene Reparaturprozesse zuzulassen – gelagert.

Anschließend wurden spezielle Blattclips an den Blättern angebracht, um Blattbereiche gleicher Größe für einige Minuten zu verdunkeln.

Diese letzte Dunkelphase diente vor allem dazu, die Reaktionszentren zu "öffnen" – also die Elektronen aus der Elektronentransportkette in nachgeschalteten Reaktionen vollständig zu verbrauchen, und dadurch gute, vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können.

In einem Fluoreszenz-Messgerät wurde anschließend jedes Blatt für 3 Sekunden mit intensivem Rotlicht bestrahlt, und die Fluoreszenz innerhalb der ersten Sekunde mit sehr hoher zeitlicher Auflösung gemessen.

Aus diesen 5 Einzelwerten pro Temperatur wurden gemittelte Kurven erstellt (Ausreißer wurden entfernt).

Tab. 1: Gewählte Temperaturen, denen die Blätter für 80 Min. ausgesetzt wurden.

Tiefkühltruhe	-18 °C
Kühlraum	5,2 °C
Raumtemperatur	23 °C
Wasserbad 1	35 °C
Wasserbad 2	45 °C



Abb. 1: Blätter mit Blattclips, vorbereitet für die Fluoreszenzmessung.

Ergebnisse

Die gemittelten Kurven sind in Abb. 3 ersichtlich, die Kerndaten (Grundfluoreszenz F_0 und F_v / F_m) in Tab. 2.

Tab. 2: Einzel- und gemittelte Messwerte aus der Fluoreszenzmessung. Grau hinterlegte Daten stellen Ausreißer dar, und wurden für die weitere Auswertung nicht verwendet.

Temperatur	F_0	F_m / F_v
-18 °C	482	0,547
	212	0,475
	183	0,460
	220	0,375
	363	0,368
Mittelwert	292	0,445

Temperatur	F_0	F_m / F_v
35 °C	798	0,674
	875	0,588
	780	0,730
	833	0,580
	676	0,801
Mittelwert	772	0,696

5,2 °C	855	0,761
	645	0,824
	725	0,800
	859	0,762
	684	0,804
Mittelwert	754	0,790

45 °C	1452	0,166
	1313	0,118
	1508	0,277
	1717	0,208
	1462	0,176
Mittelwert	1490	0,189

23 °C	717	0,803
	727	0,804
	842	0,748
	670	0,820
	663	0,804
Mittelwert	694	0,808

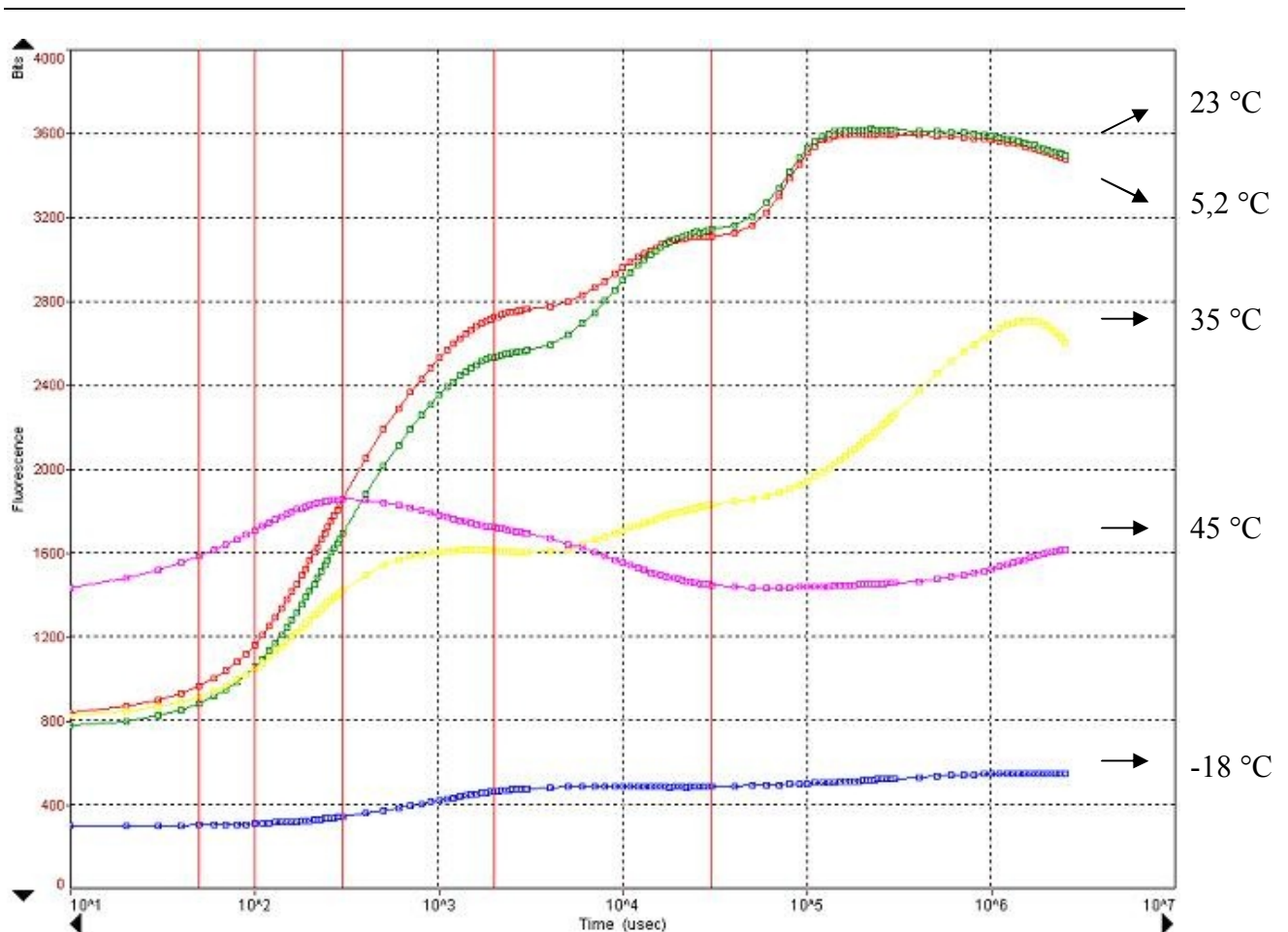


Abb. 2: Fluoreszenzkurven (gemittelt) bei 5 verschiedenen Temperaturen.

Diskussion

Die Ergebnisse entsprechen unseren Erwartungen und zeigen anschaulich den Temperatur-Toleranzbereich der Gartenbohne.

In den nachfolgenden Diagrammen (Abb. 3) wird unsere Messung der Fluoreszenz bei Raumtemperatur (23 °C) mit dem Beispiel einer Fluoreszenzkurve aus ZIRBE (1993) verglichen:

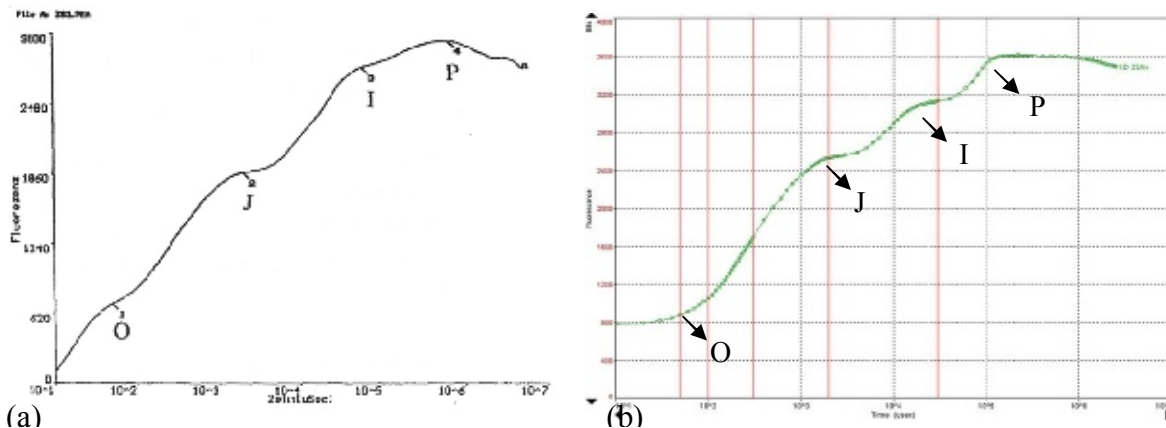


Abb. 3: Fluoreszenzkurven aus (a) ZIRBE (1993) und (b) unserer Messreihe (Raumtemperatur); O = Grundfluoreszenz F_0 , P = maximale Fluoreszenz F_m .

Aus diesen Kurven ist ersichtlich, dass sich die Reaktionszentren der Bohnenblätter bei Raumtemperatur in einem optimalen, reaktionsfähigen Zustand befinden.

Die Fluoreszenzkurve bei 5,2 °C (siehe Abb. 2, rote Kurve) zeigt nur minimale Abweichungen von der ersten Kurve, und deutet auf eine gewisse Kälteresistenz hin, wie sie auch im Verbreitungsgebiet der Wildform (Südamerika) nötig ist. Erwartungsgemäß ist der Quotient F_v / F_m , der Auskunft über den physiologischen Zustand des Blattes gibt, entsprechend hoch: 0,808 bei 23 °C und 0,790 bei 5,2 °C.

Bei 35 und 45 °C wird die Energieübertragung innerhalb der Thylakoidmembran durch die zunehmende thermische Bewegung zunehmend gestört, weil die Moleküle dadurch nicht mehr dicht gepackt sind. Diese verschlechterte Energie-Weitergabe spiegelt sich in einer höheren Grundfluoreszenz, und etwas später in einer niedrigeren Maximalfluoreszenz wider (siehe Abb. 2, gelbe und rosarote Kurven). F_v / F_m sinkt auf 0,696 bzw. 0,189 ab, und zeigt deutlich die Schädigung der Blätter.

Je niedriger die Temperatur, desto dichter werden die verschiedenen Membranen gepackt. Bei -18 °C liegt daher die Grundfluoreszenz deutlich unter den Werten der anderen Proben. Durch die anschließende Lagerung bei Raumtemperatur (Auftauen der Probe) entstehen jedoch Schäden in der Membran, die das Photosystem fast vollständig zerstören. Die Fluoreszenzkurve ist folglich kaum noch als Kurve zu erkennen (siehe Abb. 2, blaue Kurve).

Nachweis von Katalasen, Peroxidasen und Phenolasen

Einleitung

Ziel der folgenden Versuche ist die Darstellung der Enzymwirkung von Katalasen (spalten Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff), Peroxidasen (reduzieren Wasserstoffperoxid zu Wasser) und Phenole (oxidieren Phenole zu Chinonen)

a) Katalasen

Material und Methoden

- Reagenzgläser
- gekochte und ungekochte Kartoffelstücke
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 3%)
- Holzspan (für Sauerstoffnachweis)

Durchführung

In 2 großen Reagenzgläsern wurden je ein rohes und ein ungekochtes Kartoffelstück mit etwas H_2O_2 versetzt. Um den erwarteten Effekt der Sauerstoffproduktion mittels Verbrennung nachzuweisen, wurden die Reagenzgläser mit Folie abgedeckt.

Ergebnisse und Diskussion

Das Aufschäumen der Probe ist der erste zu beobachtende Effekt. Da Sauerstoff bekanntlich als Brandbeschleuniger wirkt, wurde mittels eines glimmenden Holzspans, der ins Reagenzglas gehalten wurde, die Aufspaltung von Wasserstoffperoxid in H_2O und O_2 nachgewiesen. Ein Aufflackern und Brennen des Spans konnten wir bei der ungekochten Kartoffel nur einmal beobachten. Mögliche Fehlerquellen sind das Verwenden zu weiter Gläser, wodurch schnell Stickstoff aus der Raumluft eindringen kann, oder eine zu kurze Wartezeit nach der Beschickung der Gläser.

Durch das Abkochen der Kartoffel wurden die Katalasen denaturiert, weshalb es in diesem Reagenzglas auch zu keiner Spaltung und somit nicht zur Sauerstoffbildung kam.

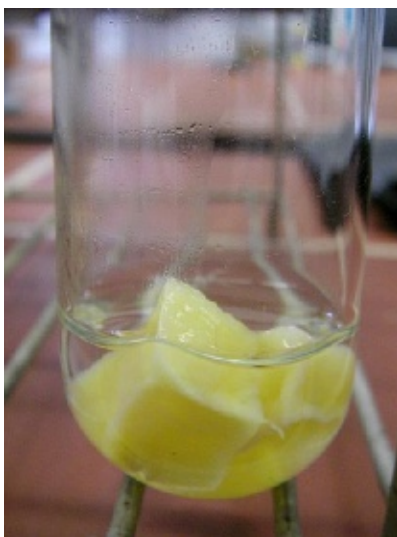


Abb. 4: Keine Katalase-Aktivität bei der gekochten Kartoffel.



Abb. 5: Katalase-Aktivität mit Schaumbildung bei der ungekochten Kartoffel.

b) Meerrettich-Peroxidase

Material und Methoden

- Meerrettichwurzel
- Geräte:
 - Mörser
 - Laborzentrifuge
- Lösungen:
 - **Guajacollösung** (50 ml, für alle Gruppen)
1 g Guajacol
50 ml Ethanol 96%

Durchführung

10 g Meerrettich wurden abgeschabt und gewogen, und mit 20ml A. dest. unter Zugabe von etwas Quarzsand zerrieben. Anschließend wurde das Homogenat für 5 Minuten bei 5.000 g zentrifugiert. 5 Reagenzgläser wurden laut dem folgenden Beschickungsplan (Tab. 3) mit dem Extrakt sowie Guajacollösung und/oder H₂O₂ befüllt und die Reaktionen anhand der Farbveränderungen beschrieben.

Ergebnisse und Diskussion

Tab. 3: Beschickungsplan mit den verschiedenen Kombinationen der Substanzen.

Reagenzglas Nr.	1	2	3	4	5
Extrakt [ml]	2	2	-	2	-
Extrakt 5 min gekocht [ml]	-	-	2	-	-
Wasserstoffperoxid [Tropfen]	3	-	3	3	3
Guajacollösung [Tropfen]	3	3	3	-	3
Ergebnisse	tiefschwarze Verfärbung	keine Reaktion	schwache Reaktion	keine Reaktion	keine Reaktion

Die notwendigen Elektronen zur Reduktion liefern Reduktionsmittel, in diesem Fall das H₂O₂ und die Guajacollösung. Diese dienen als Elektronenakzeptor und -donor und müssen zusammen mit der Peroxidase gemeinsam reagieren. Diese Bedingungen waren nur in Glas 1 und 3 gegeben, somit zeigte sich in den 3 anderen Gläsern keine Reaktion. An der Farbreaktion kann die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase festgestellt werden.

So verfärbte sich die Lösung in Glas 1 innerhalb von Augenblicken tiefschwarz.

Die schwache Reaktion, die in Glas 3 beobachtet wurde, lässt sich dadurch erklären, dass das Extrakt vermutlich nicht lange genug gekocht wurde und die Peroxidase somit nicht vollständig denaturiert wurde.



Abb. 6: Reagenzglas Nr. 1 kurz nach Zugabe der Guajacollösung.

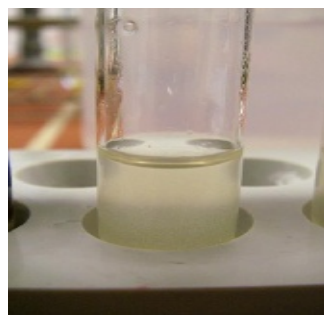


Abb. 7: Reagenzglas Nr. 2 – keine Färbung.

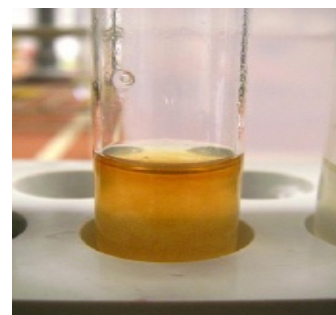


Abb. 8: Reagenzglas Nr. 3 – schwache Färbung.

c) Phenolasen

Material und Methoden

- Laubblätter aus dem botanischen Garten
- Bananenschale
- Geräte:
 - Regelbares Wasserbad

Durchführung

Die Aufgabe unserer Gruppe war es, Phenolasen-Versuche an noch turgeszenten Laubblättern von Pflanzen aus dem botanischen Garten durchzuführen. Wir wählten ein Rosengewächs (Rosaceae).

Eine heiße Münze, die für 30 Sekunden auf eines der Blätter gelegt wurde, führte sofort zur Ausbildung eines sogenannten "Todesrings" auf der Blattspreite – einer braunen Verfärbung um den Münzrand. Das Eintauchen eines Blattteiles in ein Wasserbad mit 100 °C führte zu einer ähnlichen Verfärbung (Abb. 9).

Auch bei der Bananenschale wurde im 90°C Wasserbad eine Schwärzung des eingetauchten Teils beobachtet.

Ergebnisse und Diskussion

Im Bereich der Auflagefläche der heißen Münze kam es deshalb zu keiner Verfärbung, da sowohl Zellen als auch Enzyme sofort zerstört wurden. Rundherum führten die nicht inaktivierten Phenoloxidasen zur Bildung dunkler Polyphenole. Diese Reaktion wird vom Luftsauerstoff beschleunigt.

Wird ein Blatt für längere Zeit komplett ins warme Wasserbad getaucht wird es gänzlich braun. Nach 10 Minuten bei 65 °C war unser Rosaceen-Blatt komplett verfärbt.



Abb. 9: Verfärbungen bei Eintauchversuch (links) und Wasserbad (rechts)

Die enzymatische Bestimmung von Ethanol mit dem optischen Test: Aktivität der Alkoholdehydrogenase (ADH)

Einleitung

Ziel dieser Versuchsreihe ist die Bestimmung des Alkoholgehaltes verschiedener Ansätze. Dazu wird der Umstand genutzt, dass sich bei den stattfindenden Reaktionen auch die Extinktionswerte ändern. NADH_2 und NADPH_2 absorbieren nämlich stark im UV-Bereich (Maximum bei 340 nm), während ihre Edukte NAD und NADP dort kaum absorbieren. Aus dieser Änderung lässt sich (im direkten Vergleich mit Messungen bekannter Konzentrationen) die Alkoholkonzentration in der zu messenden Probe ermitteln.

Material und Methoden

- Lösungen:
 - **Puffer** (100 ml)
3,0 g " $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ "
1,0 g Senicarbazidhydrochlorid
200 mg Glycin
80 ml A. bidest.
mit 2 N NaOH-Lösung auf pH 8,8 einstellen
 - **NAD-Lösung** (0,5 ml)
60 mg NAD
0,5 ml A. bidest.
 - **ADH-Präparat aus Hefe** [Lycophilisat ca. 300 Einheiten/mg Protein]
20 mg ADH-Präparat
2 ml Puffer
 - **Äthanol-Stammlösung** (100 ml)
200 mg Ethanol (HPLC-grade)
100 ml A. bidest.

Die Äthanol-Stammlösung wurde von Gruppe A erstellt, Puffer, NAD- und ADH-Lösung von Gruppe B.

Aus der Äthanol-Stammlösung wurden folgende vier Standardlösungen hergestellt. Es wurde jeweils auf 10 ml mit A. bidest. aufgefüllt:

- Ansatz 1: 0,1 ml Stammlösung
- Ansatz 2: 0,5 ml Stammlösung
- Ansatz 3: 1,0 ml Stammlösung
- Ansatz 4: 5,0 ml Stammlösung

Weiters wurden noch folgende Ansätze verwendet:

- Ansatz 5: unverdünnte Stammlösung
- Ansatz 6: A. bidest (Nullprobe)
- Ansatz 7: Rotwein 1:1000

Ergebnisse und Diskussion

Die Umwandlung von NAD zu NADH₂ bewirkt eine Extinktionsänderung bei 340 nm (die Extinktion steigt an). Bei unserem Versuch wurde ein Überschuss an NAD und nicht an Ethanol oder Enzym verwendet, um die umgesetzte Menge Ethanol bestimmen zu können.

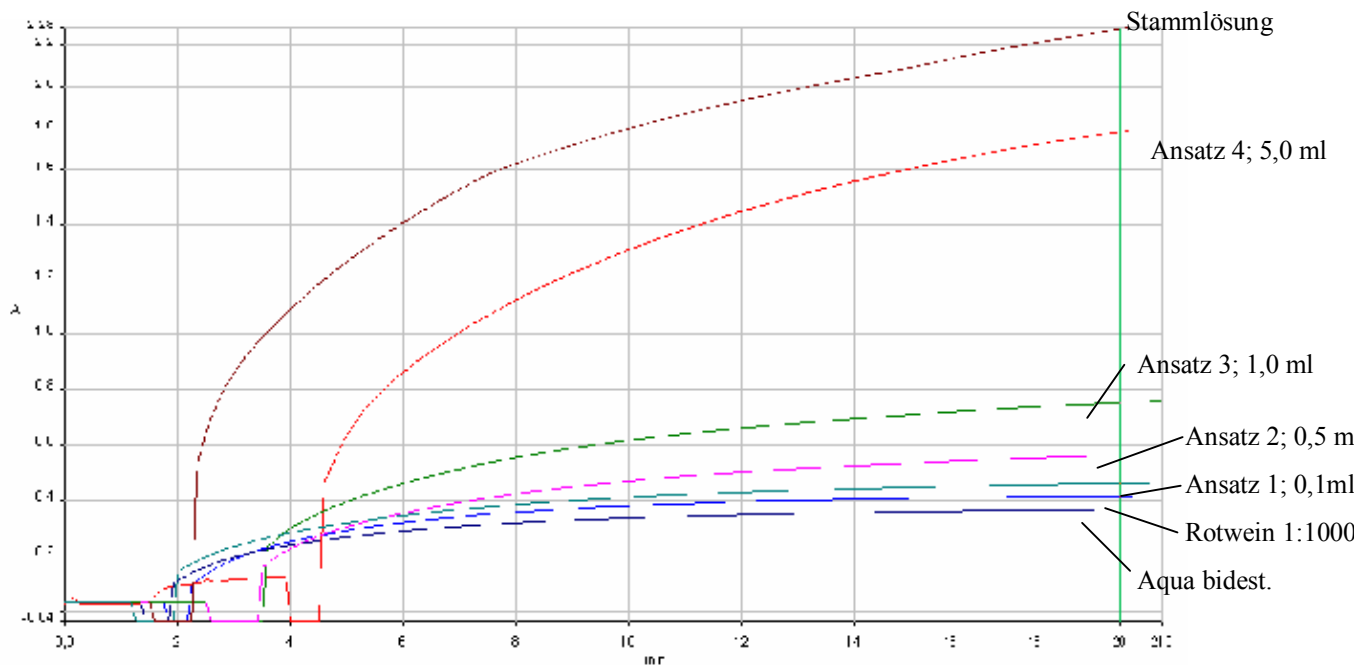


Abb. 10: Extinktionskurven bei verschiedenen Alkoholkonzentrationen.

Man kann erkennen, dass die Reaktionen bei Ansatz 4 (5,0 ml) und bei der unverdünnten Stammlösung bei weitem nicht abgeschlossen sind. Die Auswirkungen auf die Eichkurve sind in Folge dargestellt.

Achtung: In den Küvetten dürfen sich keine Rückstände befinden, weil sonst das Ergebnis verfälscht würde. Dies dürfte auch bei Ansatz 6 (A. bidest) der Fall gewesen sein. Die Extinktionswerte (Reaktionskurve!) des Aqua bidest unterscheiden sich deshalb nicht sehr stark von denjenigen des Weins.

Tab. 4: Extinktionsänderung bei verschiedenen Alkoholkonzentrationen.

Ansatz Nr.	Alkohol μg	E ₀ Minuten	E ₂₀ Minuten	E _{total}	Anmerkung
1	1	0,03180	0,46123	0,42942	
2	5	0,03284	0,56311	0,53026	
3	10	0,03220	0,75368	0,72147	
4	50	0,02660	1,78240	1,75579	
5	100	0,03580	2,27800	2,24219	Unverdünnte Stammlösung
6	0	0,03685	0,36472	0,32786	A. bidest als Leeransatz
7	?	0,03518	0,41630	0,38111	Weinprobe

Aus den gewonnenen Daten konnte die folgende Eichkurve erstellt werden:

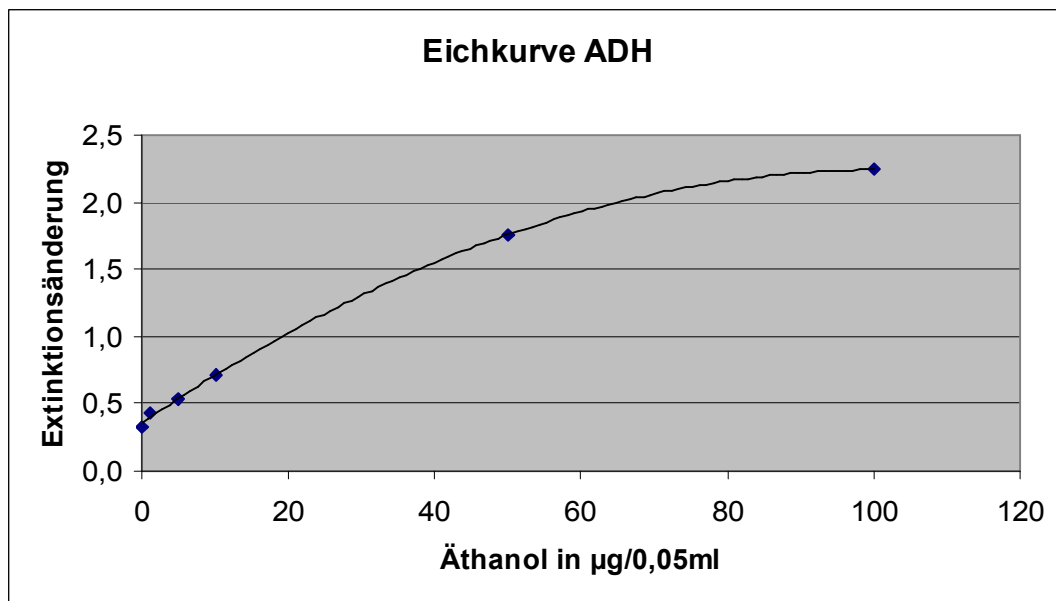
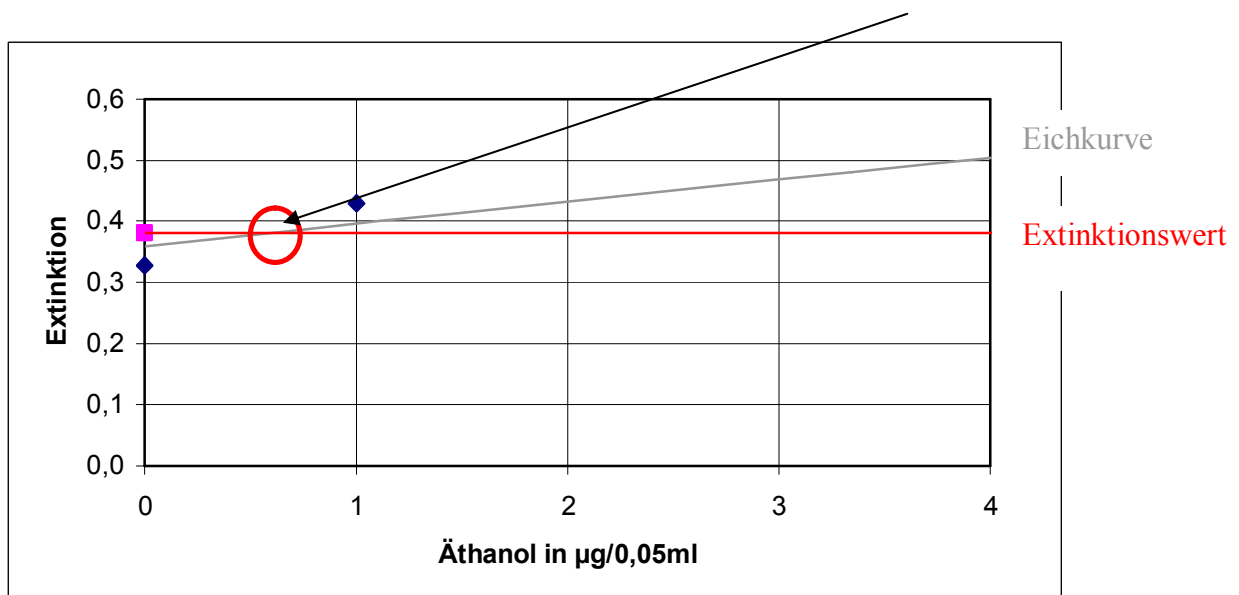


Abb. 11: Eichkurve mit den erhobenen Werten.

Die Kurve ist aus den folgenden Gründen ungenau:

- Nullprobe (Aqua bidest) weist ungewöhnlich hohe Extinktion auf (Verunreinigung?)
- Reaktionen waren bei hohen Alkohol-Konzentrationen auch nach 20 Minuten noch nicht abgeschlossen (Kurve würde sich sonst einer Geraden nähern). Aus Zeitgründen war der Versuch jedoch auf 20 Minuten pro Probe beschränkt.
- Reaktionszeit war durch Ungenauigkeiten beim Versuch (unterschiedlicher Zeitpunkt der ADH-Zugabe) nicht für alle Proben genau gleich lang.

Möchte man nun durch die Eichgerade und den Extinktionswert der Weinprobe den Alkoholgehalt des Weines bestimmen, erhält man einen Wert von ca. 0,65 $\mu\text{g}/0,05\text{ ml}$.

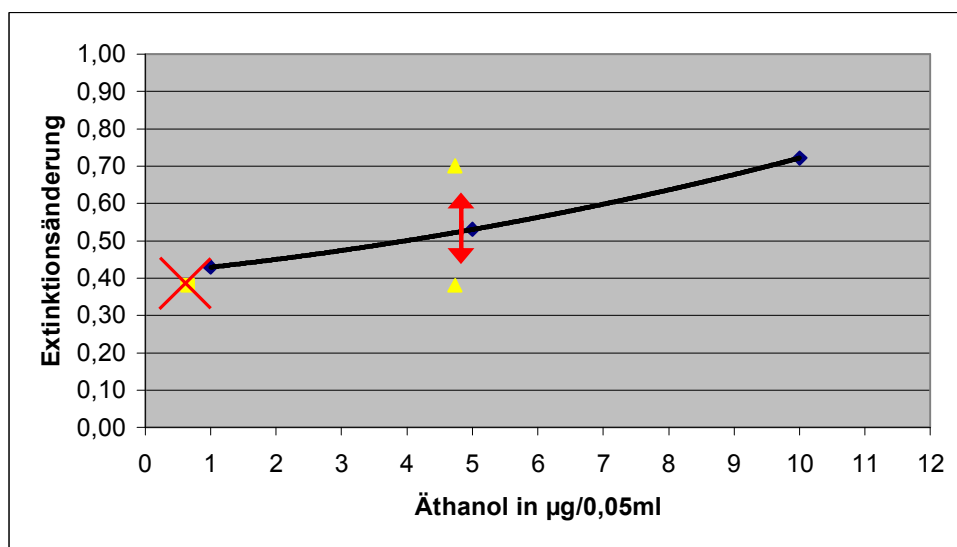


Rechnerische Ermittlung des Alkoholgehaltes von Ansatz Nr. 7 (es wurde Wein mit 12 % Alkoholgehalt verwendet):

0,12 ml/ml Dichte: 0,7894
0,094728 g/ml
94,728 µg/ml in Verdünnung 1:1000
4,7364 µg/0,05 ml

Der errechnete Wert von 4,7 µg/0,05 ml stimmt jedoch nicht mit dem ermittelten Wert aus der Eichkurve (0,65 µg/0,05 ml) überein.

Die folgende Eichkurve wurde nur mit den drei zuverlässigsten Werten erstellt. Laut errechnetem Alkoholgehalt der Weinprobe sollte sich der Extinktionswert bei ca. 0,53 befinden (roter Pfeil) und nicht bei 0,38.



Mögliche Gründe für diese starke Abweichung:

- Angegebener Alkoholgehalt des Weines war nicht korrekt
- Ungenauigkeiten bei der Verdünnung
- Berechneter Wert ist falsch

Die Interpretation dieser Ergebnisse ist noch Gegenstand intensiver Diskussion.



Abb. 12: Gruppe A beim Diskutieren der Ergebnisse.

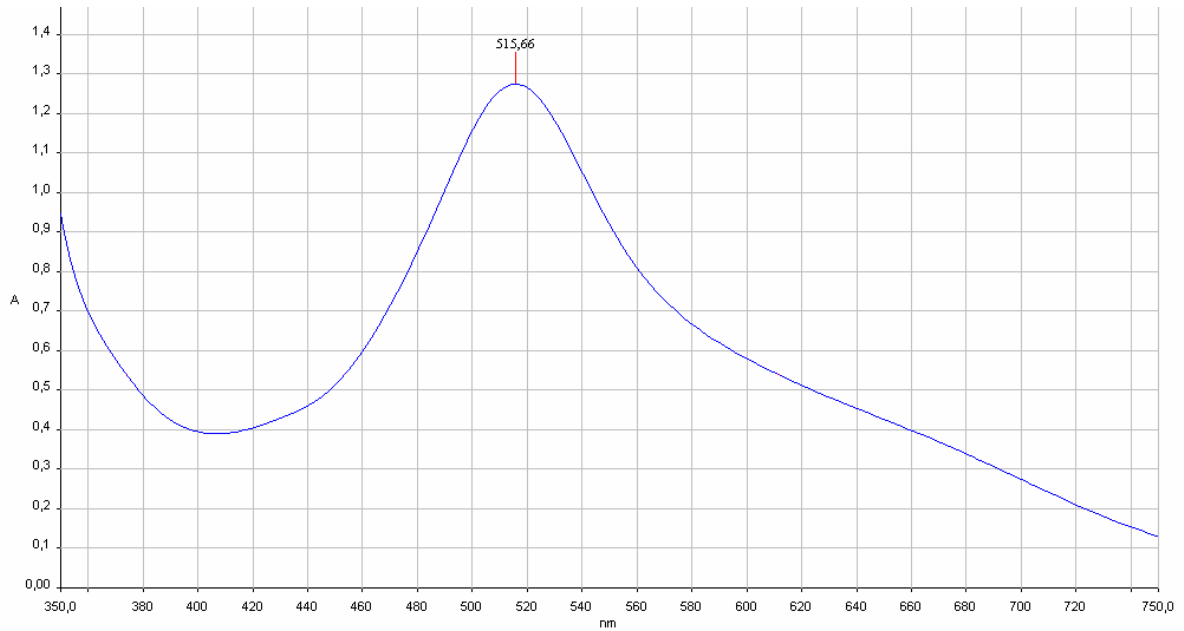


Abb. 13: Absorptionsspektrum der DPPH-Lösung.

Ergebnisse und Diskussion

α -Tocopherol:

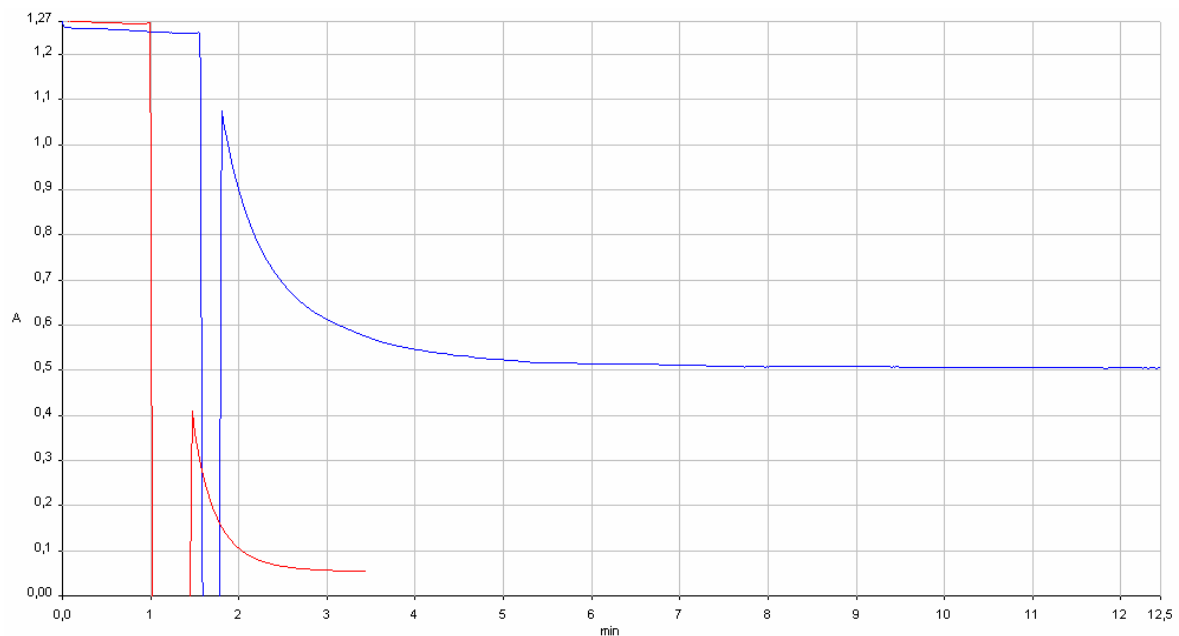


Abb. 14: Absorptionsmessung mit α -Tocopherol (rot = 50 μ l, blau = 10 μ l).

Die Abnahme der Extinktion war mit 50 μ l α -Tocopherol viel zu stark (der Endwert sollte über 0,2 liegen), daher wurde die Aufzeichnung abgebrochen.

Die Reaktion mit 10 μ l hat nach ca. 12 min einen "steady state" bei 0,5 erreicht – die Messung konnte daher vorzeitig abgebrochen werden.

Olivenöl:

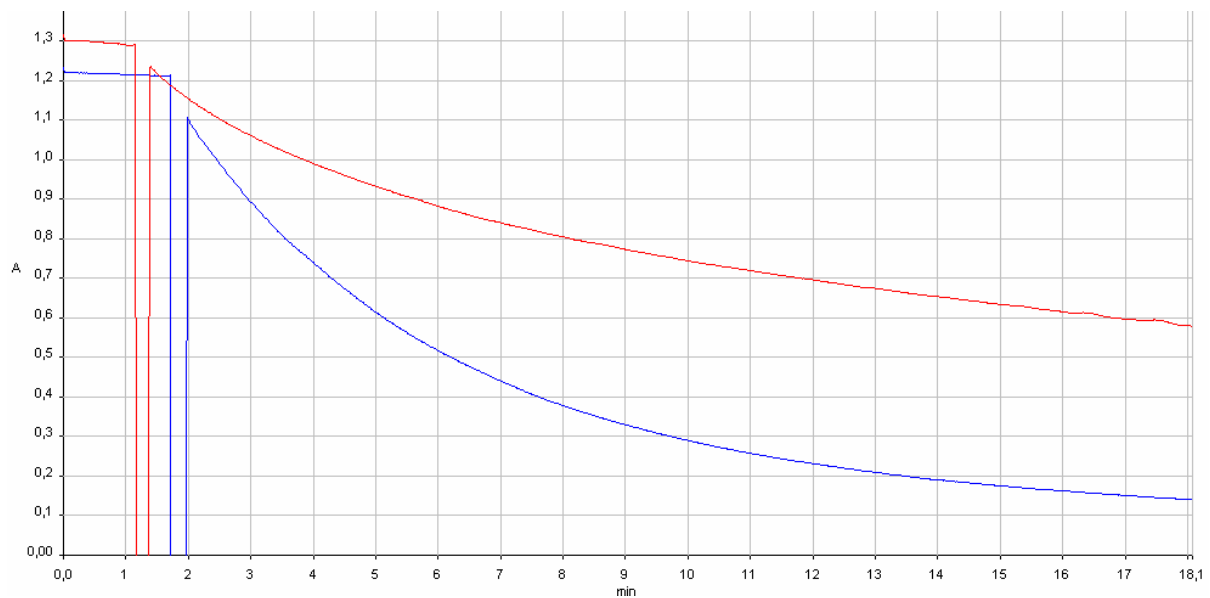


Abb. 15: Absorptionsmessung mit Olivenöl-Extrakt (rot = 0,05 ml Extrakt, blau = 0,1 ml Extrakt).

Auch die Reaktion bei 0,1 ml Olivenöl-Extrakt war viel zu stark. Mit 0,05 ml Extrakt wurde nach 30 min ein Wert von 0,4174 erreicht, wobei hier immer noch kein "steady state" eintrat.

Rotwein:

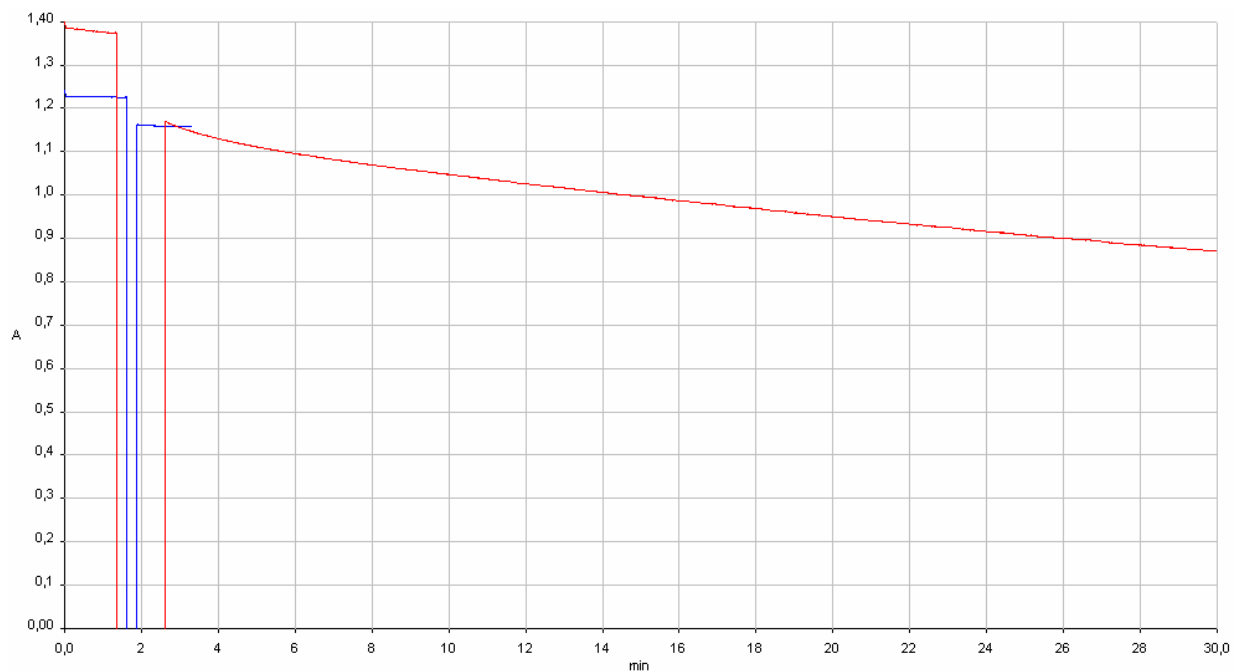


Abb. 16: Absorptionsmessung mit Rotwein (rot = 0,05 ml Rotwein 1:10, blau = 0,1 ml Rotwein 1:1000).

Die Reaktion mit 1:1000 verdünntem Rotwein war zu schwach, daher wurde eine neue Messung mit höherer Konzentration gestartet. Bei einer Verdünnung von 1:10 erreichte die Kurve nach 30 min einen Wert von 0,8708, wobei kein "steady state" erreicht wurde.

Vergleich der gelungenen Messungen:

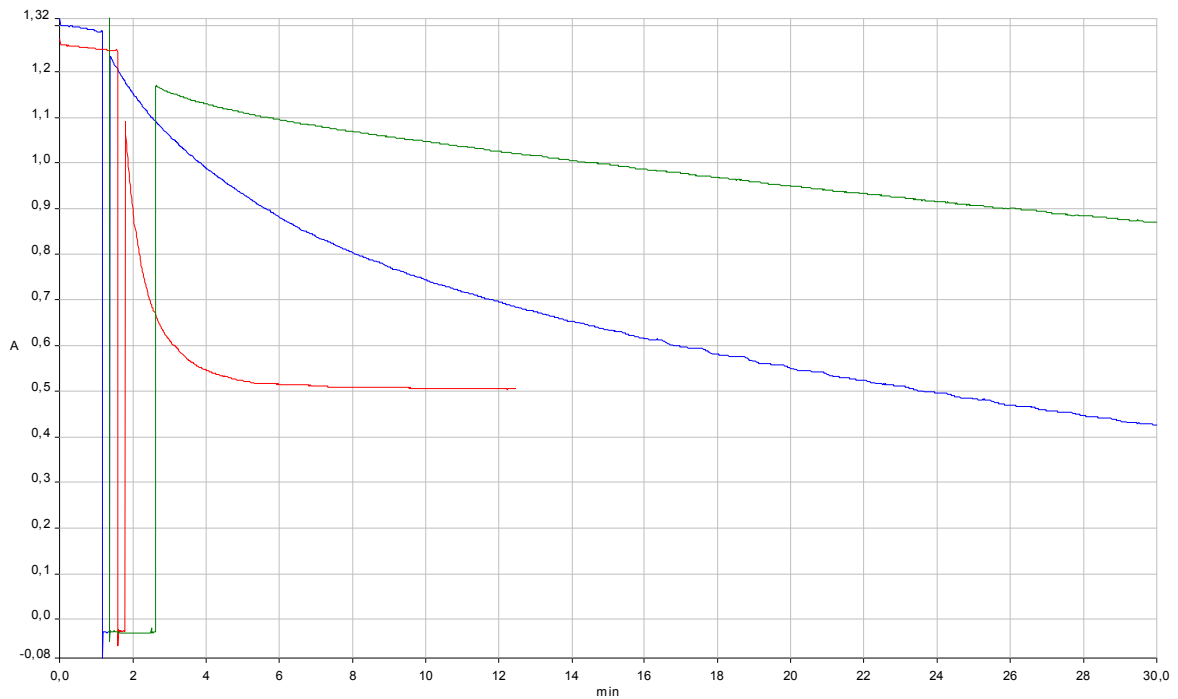


Abb. 17: Vergleich der Messkurven der gelungenen Messungen (rot = α -Tocopherol, blau = Olivenöl, grün = Rotwein).

Bei α -Tocopherol konnte eine Mittlere Kinetik festgestellt werden (innerhalb von 5-30 min wird der "steady state" erreicht).

Die Messungen mit Olivenöl und Rotwein ergaben eine langsame Kinetik (bis zu mehrere Stunden bis zum Erreichen des "steady state").

Vergleich der Wirksamkeit:

Tab. 5: Vergleich der Wirksamkeit der getesteten Substanzen. E_0 = Extinktion ohne DPPH, E_{30} = Extinktion 30 Minuten nach DPPH-Zugabe, rel. W. = Relative Wirksamkeit, bezogen auf α -Tocopherol (z.B. 1 Einheit Olivenöl-Extrakt ist so wirksam wie 0,22 Einheiten der verwendeten α -Tocopherol-Lösung). Farbhinterlegung entsprechend den Kurven in Abb. 17.

Substanz	μl	E_0	E_{30}	ΔE	rel. W.
α -Tocopherol 6mM	10	1,2870	0,5051	-0,7819	-
Olivenöl	50	1,3052	0,4174	-0,8878	0,22
Rotwein 1:10	50	1,3848	0,8708	-0,5140	0,13

Trennung und Charakterisierung von Pigmenten der Chloroplasten

Einleitung

Die Photosynthese als wichtige biochemische Reaktion bei Pflanzen ist unter anderem von einer geordneten räumlichen Assoziation von Pigmenten in der Thylakoidmembran abhängig. Ziel dieses Versuches ist es diese Pigmente der Chloroplasten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie bzw. HPLC (high performance liquid chromatography) zu trennen und zu bestimmen.

Material und Methoden

- Frische Blätter von *Spinacia oleracea*
- Geräte:
 - Mörser
 - Zentrifuge
 - DC mit Kieselgurplatte
 - Photometer
 - HPLC
- Lösungen:
 - **DC-Laufmittel**
99 ml n-Pentan
11 ml tert. Butylalkohol
12 ml Aceton
 - **Für Pigmentextrakt**
0,5 g Spinatblätter
4,5 ml Aceton 90%
Spatelspitze CaCo₃ (als Puffer)
Quarzsand

Herstellen des Pigmentextraktes

Die Zutaten wurden in einem vorgekühltem Mörser zerrieben bis eine homogene Flüssigkeit entstand. Es wurden zwei Parallelproben hergestellt. Das Extrakt wurde nicht wie im Skript angegeben vorfiltriert sondern sofort bei 5.000 g für 5 min zentrifugiert. Alle Vorgänge fanden im Kühlraum mit vorgekühlten Geräten statt, um den Abbau der Pigmente zu verlangsamen.

Probe 1 – 4,1 ml

Probe 2 – 5,4 ml

Diese verschiedenen Mengen resultieren daraus, dass Reste des Extraktes mit einer nicht genau festgelegten Menge Aceton aus dem Mörser gespült wurden.

Es wurde leider verabsäumt, die Absorptionsspektren der Gesamtextrakte im Photometer zu ermitteln. Nur Probe 2 wurde mittels HPLC untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Dünnschichtchromatographie

Von Probe 1 wurden 0,8 ml mit einer Mikroliterspritze auf die Kieselgurplatte aufgetragen (Startzone 2 cm über unterem Rand der Platte).

Nachdem die so behandelte Platte im Dunkeln wieder getrocknet war, wurde sie in eine Laufkammer mit dem Laufmittel gestellt und für eine Stunde laufen gelassen. Nachdem die Banden auch noch unter UV-Licht betrachtet wurden, wurden sie markiert, abgekratzt und in Äthanol (Carotinoide) oder 80 % Aceton (Chlorophylle) gelöst.

Die Pigmente wurden in folgender Reihenfolge aufgetrennt:

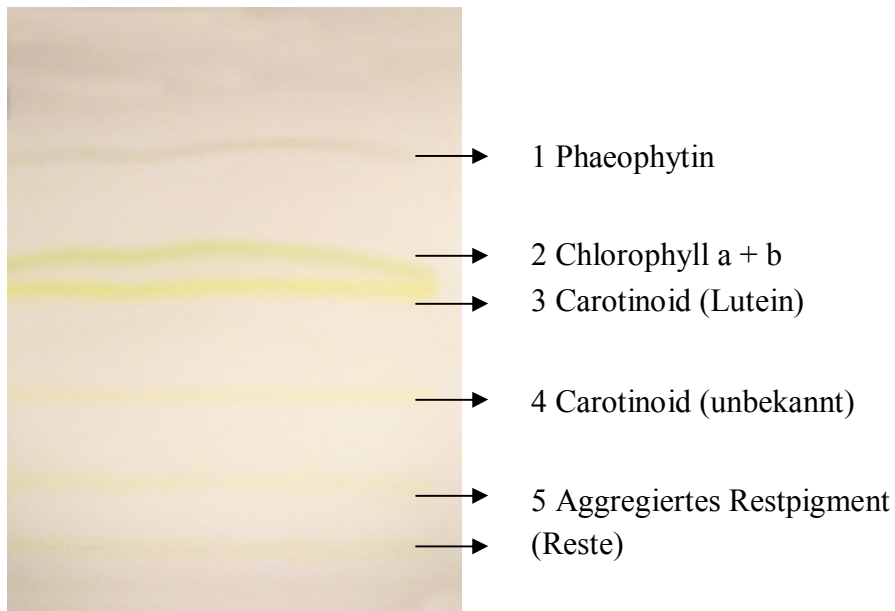


Abb. 18: Kieselgurplatte nach erfolgter Dünnschichtchromatographie.

Durch zweimaliges Zentrifugieren der so erhaltenen Pigmentextrakte wurde der Kieselgur entfernt und saubere Proben für die Analyse im Photometer hergestellt. Der Abbau der Pigmente sollte minimiert werden durch schnelles Arbeiten bei niedrigen Temperaturen und bei Dunkelheit (bzw. Kunstlicht).

Ergebnisse der Spektralanalyse der einzelnen Banden:

Bande 1 – Phaeophytin

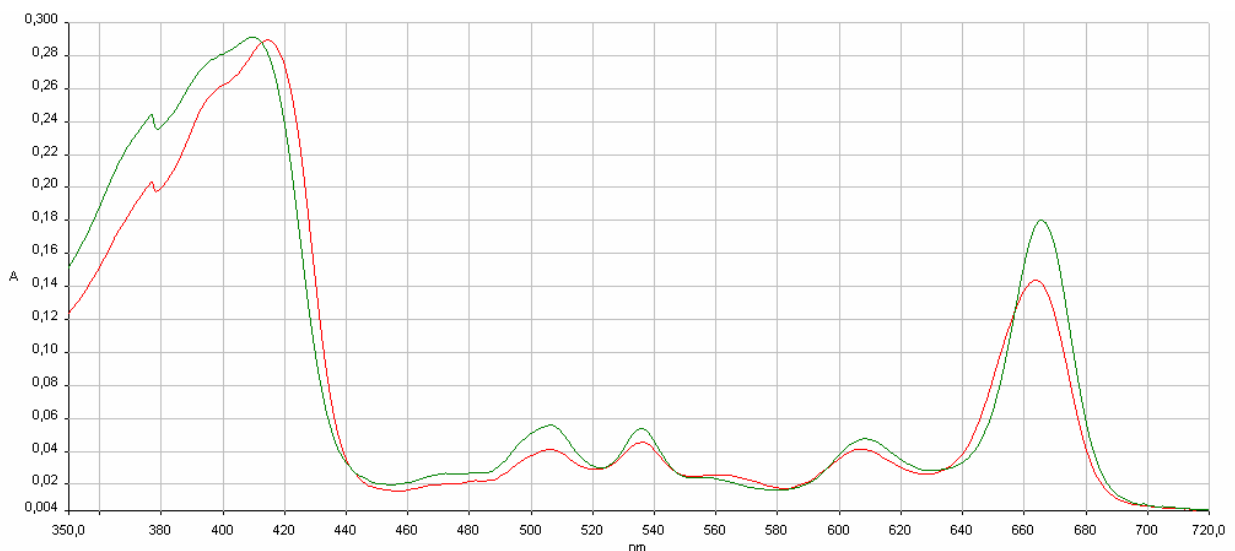


Abb. 19: Absorptionsspektrum von Bande 1 vor (grün) und nach (rot) Zugabe von 50 μ l 10 % HCl.

Bande 2 – Chlorophyll b

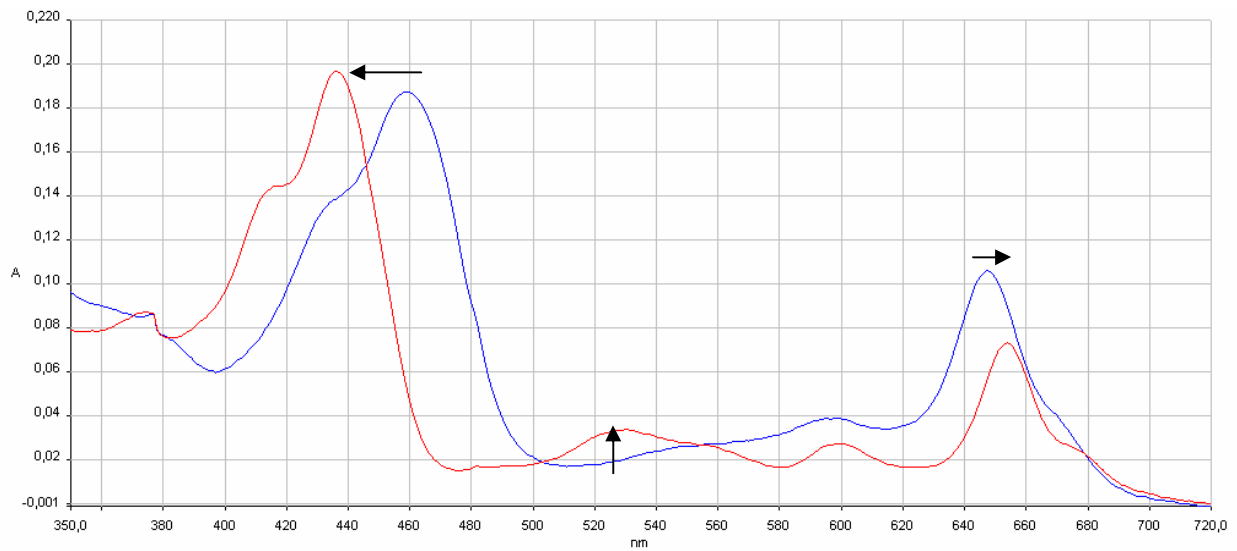


Abb. 20: Absorptionsspektrum von Bande 2 vor (blau) und nach (rot) Zugabe von 50 µl 10 % HCl.

Durch die Zugabe von HCl wird das zentrale Mg-Atom aus dem Porphyrinring des Chlorophylls entfernt. Es wird also zu Pheophytin abgebaut – die Absorption ändert sich dementsprechend (Pfeile).

Quantifizierung:

$$20,31 \cdot E_{647} - 4,91 \cdot E_{663} = \underline{0,10667 \mu\text{g Chlb/ml}}$$

Bande 3 – Lutein

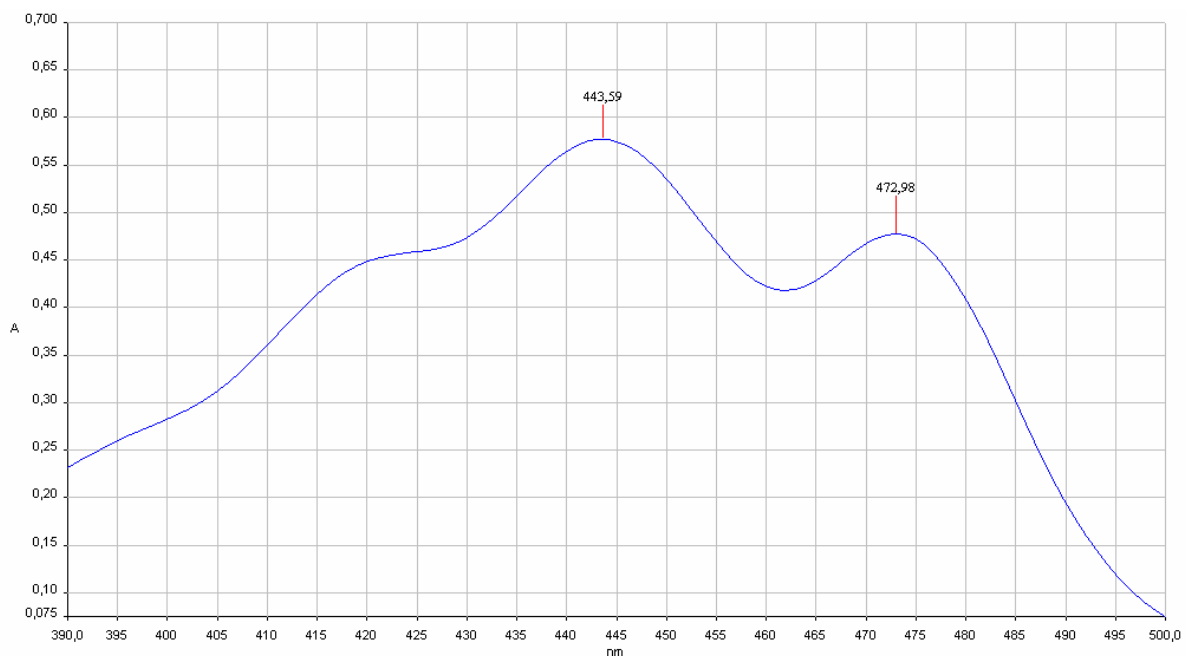


Abb. 21: Absorptionsspektrum von Bande 3.

Bande 4 – unbekanntes Carotinoid

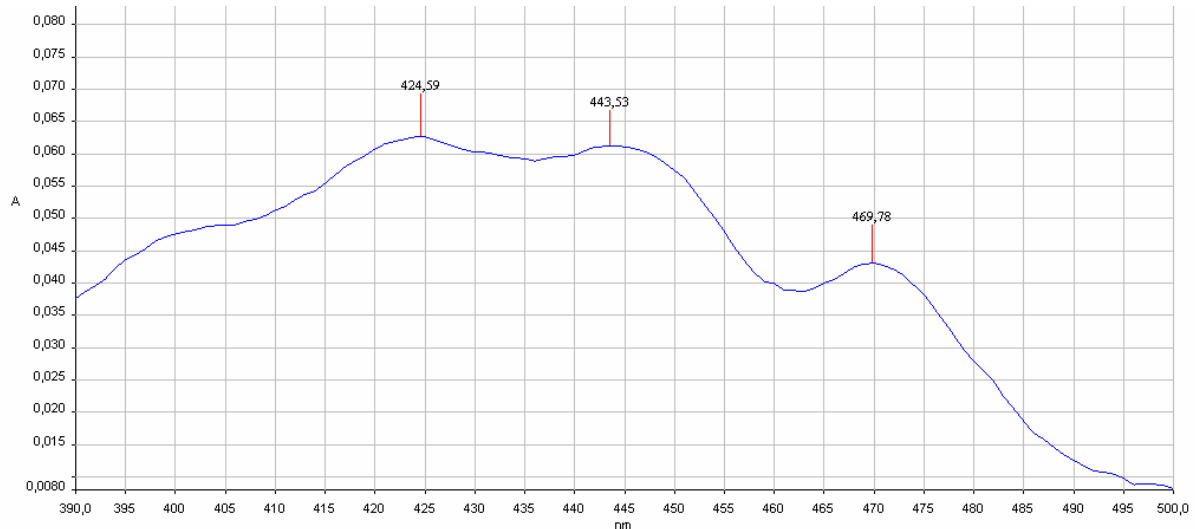


Abb. 22: Absorptionsspektrum von Bande 4.

Die Bande konnte aufgrund der unscharfen Werte nicht eindeutig identifiziert werden. Es handelt sich um ein Carotinoid.

Bande 5 – Chlorophyll a

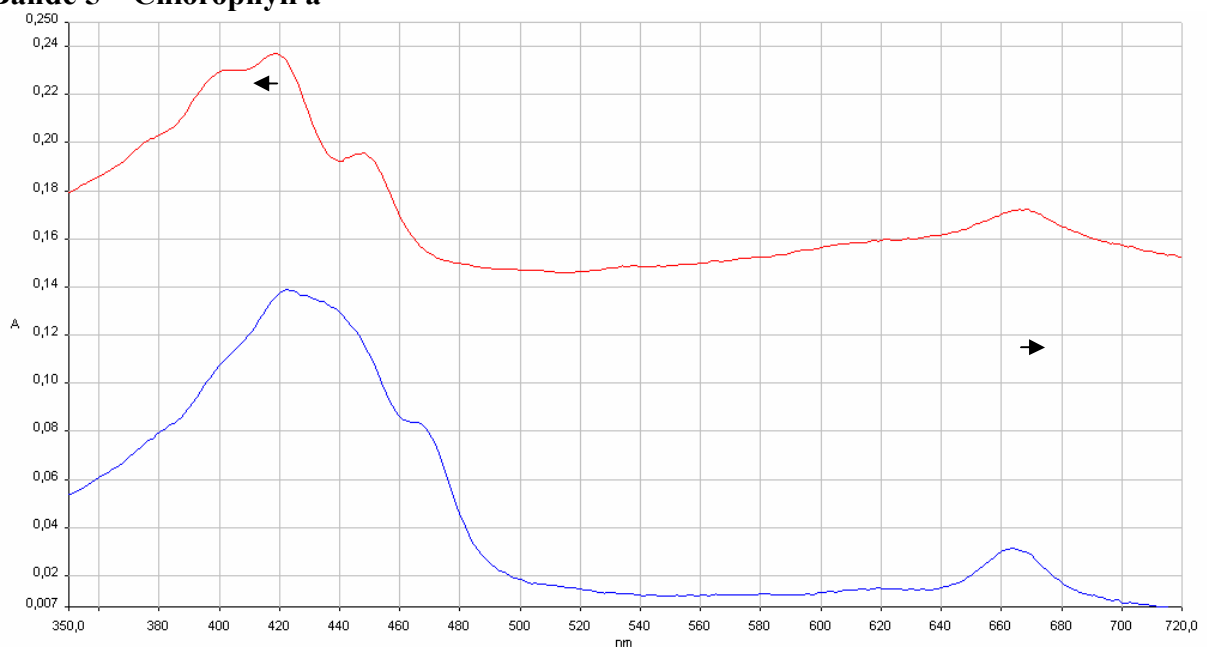


Abb. 23: Absorptionsspektrum von Bande 5 vor (blau) und nach (rot) Zugabe von 50 µl 10 % HCl.

Die Bande konnte als Chlorophyll a identifiziert werden, wobei eine Verunreinigung mit Chlorophyll b gegeben sein dürfte (weil zusätzlicher Peak bei ca. 460 nm).

Durch die Zugabe von HCl findet wieder eine Verschiebung der Absorptionsmaxima statt (Pfeile). Dass keine Extinktionszunahme im Grünbereich erfolgte, ist wahrscheinlich auf eine zu kurze Inkubationszeit mit HCl zurückzuführen. Für den signifikanten Anstieg der Extinktion nach Zugabe von HCl haben wir keine Erklärung (Verunreinigung?).

Quantifizierung:

$$12,25 \cdot E_{663} - 2,55 \cdot E_{647} = \underline{1,9737 \mu\text{g Chla/ml}}$$

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

Die HPLC stellt ein chromatographisches Trennverfahren dar, wobei die zu untersuchende Substanz mit einer anderen Flüssigkeit (mobile Phase) unter hohem Druck durch eine Trennsäule geführt wird. Die Trennsäule ist mit einem bestimmten festen Material befüllt (stationäre Phase) welches je nach Bedarf verschiedene Eigenschaften hat.

Die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Substanzen in der Probe mit der stationären Phase bestimmen die Elutionszeit. So durchqueren apolare Substanzen eine polare stationäre Phase schneller als polare Substanzen. Auch die Polarität des Lösungsmittels hat Auswirkungen auf die Elutionszeit.

Vorteile der HPLC:

Hohe Trennschärfe
Geringe Menge reicht aus
Computer wertet Daten sofort aus

Nachteile HPLC:

Teuer und rel. Kompliziert (Vorkenntnisse!)
Technische Defekte häufiger

DC – Dünnschichtchromatographie

Die DC ist ein physikalisch-chemisches Trennverfahren, das zur Untersuchung der Zusammensetzung von Proben benutzt wird. Die stationäre Phase ist aber nicht wie bei der HPLC eine Säule sondern eine Platte, welche mit einer pulverartigen Substanz (z.B. Kieselgur) beschichtet ist.

Durch Kapillarkräfte saugt sich das Laufmittel über die Platte nach oben und die Substanzen der Probe werden mittransportiert. Wie bei der HPLC gibt es eine Wechselwirkung der stationären Phase mit den Substanzen, die deshalb verschieden schnell transportiert werden – es entstehen Banden.

Vorteile der DC:

Kostengünstig und einfach
Rasche Trennung
Überall durchführbar

Nachteile DC:

Ungenau
Auswertung visuell

HPLC – Probe 2

Die HPLC wurde mit Probe 2 durchgeführt, weil bei Probe 1 nach der Durchführung der Dünnschichtchromatographie schon ein offensichtlicher Abbau der Pigmente stattgefunden hatte (helle Farbe im Vergleich zu Probe 2).

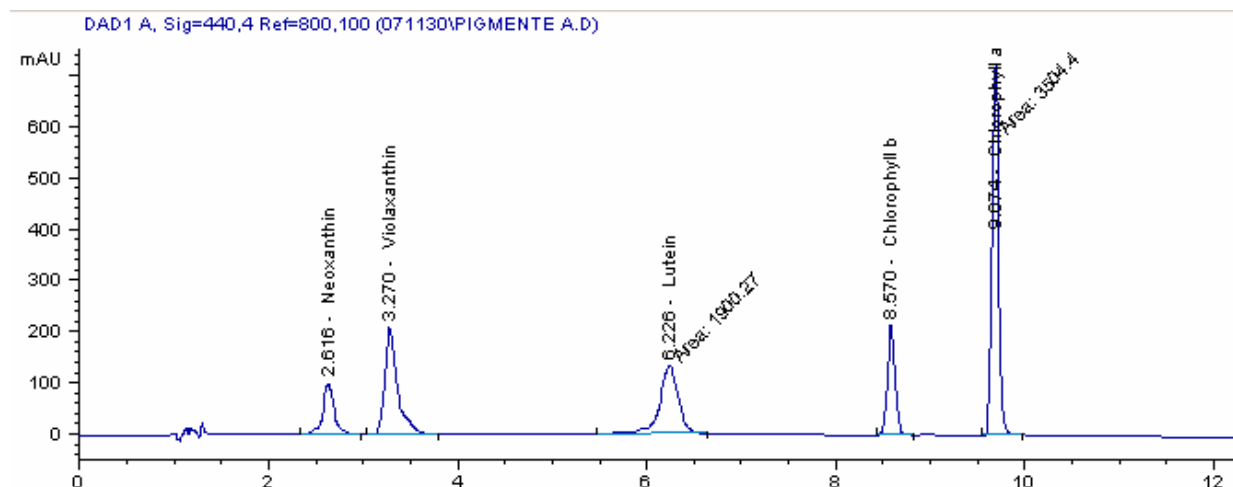


Abb. 24: Chromatogramm mit Probe 2.

Messung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion an isolierten Chloroplasten

Einleitung

Photosynthese, der vermutlich wichtigste Prozess im Pflanzenreich und Grundvoraussetzung für (photo-)autotrophes Leben, wird in diesem Versuch an einem frisch hergestellten Chloroplasten-Extrakt beobachtet.

Um Informationen über die Qualität der photosynthetisch aktiven Zellorganellen zu erhalten, wird als Reaktionsgefäß eine Sauerstoffelektrode verwendet. Die gewonnenen Daten werden über eine Datenleitung zum PC übertragen und dort mit Hilfe eines speziellen Programms ausgewertet. Über Licht- und Dunkelphasen kann die Brutto-Sauerstoffproduktion ermittelt werden.

Außerdem wird in diesem Experiment der Wirkungsgrad des Totalherbizids DCMU (Markenname Diuron) überprüft, das die Elektronentransportkette zwischen Photosystem II und PS I blockiert.

Material und Methoden

- Frische Blätter von *Spinacia oleracea*
- Geräte:
 - Messerhomogenisator
 - Laborzentrifuge
- Lösungen:
 - **Stammlösung** (100 ml, 10fach konzentriert)
 - 0,5 M Tricin entspr. 12,26 g
 - 50 mM MgCl₂ (wasserfrei) entspr. 476 mg
 - 20 mM MnCl₂ entspr. 251 mg
 - 5 mM K₂HPO₄ entspr. 68 mg
 - mit NaOH auf pH 7,8 einstellen

Reihenfolge: Zuerst Feststoffe/Substanzen in etwas Lösungsmittel auflösen, zusätzlich etwas LM hinzufügen, dann den pH einstellen, und schließlich auf das endgültige Volumen auffüllen.

- **Chloroplasten-Isoliermedium** (200 ml)
 - 20 ml Stammlösung
 - 0,5 M Sorbit entspr. 18,2 g
 - mit A. dest. auf 200 ml auffüllen

Frisch herstellen.
- **Ferricyanidlösung** (10 ml)
 - 165 mg K₃Fe(CN)₆ mit A. dest. auf 10 ml auffüllen
- **NaHCO₃-Lösung** (5 ml)
 - 0,3 M NaHCO₃ entspr. 126 mg
 - mit A. dest. auf 5 ml auffüllen
- **DCMU-Ansatz** (100 ml)
 - 0,01 M DCMU entspr. 23 mg
 - 5 ml Methanol, 5 ml A. dest., anschl. 1:10 verdünnen mit A. dest.

Extraktion der Plastiden:

Ca. 10 g Blätter wurden im Messerhomogenisator mit 100 ml Isoliermedium zerkleinert, filtriert und in kalten Zentrifugengläsern 5 min bei 300 g zentrifugiert.

Das entstehende Sediment wurde zwar nicht (wie im Skriptum angegeben) im Lichtmikroskop untersucht, müsste aber generell aus den schwereren Zellbestandteilen bestehen – z.B. ganze Zellen, Zellwand-Bruchstücke und Zellkerne. Der Überstand wurde noch einmal für 10 Minuten bei 4.500 g zentrifugiert, das verbleibende Sediment in ca. 30 ml Chloroplasten-Isoliermedium resuspendiert und ein letztes Mal zentrifugiert (10 min bei 4.500 g). Resultat war ein neues Sediment, in dem die zu messenden Chloroplasten angereichert waren. Dieses wurde noch einmal in etwas Isoliermedium suspendiert und als Chloroplastensuspension für die Sauerstoffmessung verwendet.



Abb. 25: Spinat vor und nach dem Homogenisieren.

Sauerstoffmessung:

Die Sauerstoffelektrode wurde an diesem Tag zum ersten Mal verwendet, daher mussten wir das Gerät zuvor eichen. Anschließend wurde die Lichtquelle überprüft und so eingestellt, dass 500 μmol Photonen / cm^2 auf die Reaktionskammer treffen würden.

In die Messkammer wurden folgende Substanzen gefüllt:

- 1,3 ml Isoliermedium
- 0,1 ml NaHCO_3 -Lösung
- 0,1 ml Ferricyanidlösung
- 0,05 ml Chloroplastensuspension

Die Kammer wurde verschlossen, und es wurde zuerst für mindestens 1 min bei Dunkelheit gemessen. Nach dieser "Einstellungszeit" wurde die Änderung der Sauerstoffkonzentration bei abwechselnden Licht-/Dunkelphasen von je ca. 1 Minute aufgezeichnet.

Auf die 3. Lichtphase folgte die Zugabe von DCMU, anschließend noch eine letzte Dunkelphase zum Vergleich. Die verschiedenen Produktionsphasen wurden mithilfe eines speziellen Computerprogramms ausgewertet.

Es wurden 3 Sauerstoffmessungen nach dieser Anleitung durchgeführt (bei Messung 1 wurde fälschlicherweise DCMU-Ansatz 1 verwendet – also 10fach verdünnte Lösung im Vergleich zu den Angaben im Skriptum, Messung 2 wurde frühzeitig abgebrochen, Erläuterungen siehe Diskussion).

Aus den gewonnenen Daten wurde die Brutto-Sauerstoffproduktion ermittelt, und mithilfe einer zusätzlichen Analyse im Spektrometer in die standardisierte Einheit $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg}^{-1}$ Chlorophyll $\cdot \text{h}^{-1}$ umgerechnet.

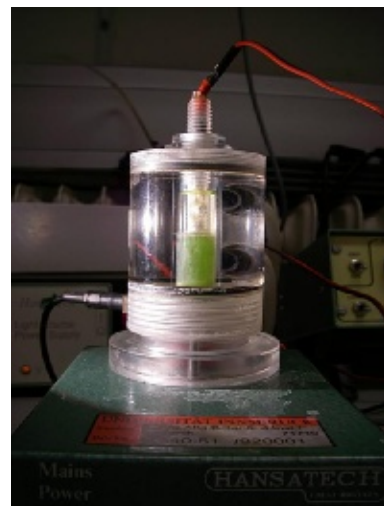


Abb. 26: Messkammer mit Sauerstoffelektrode.

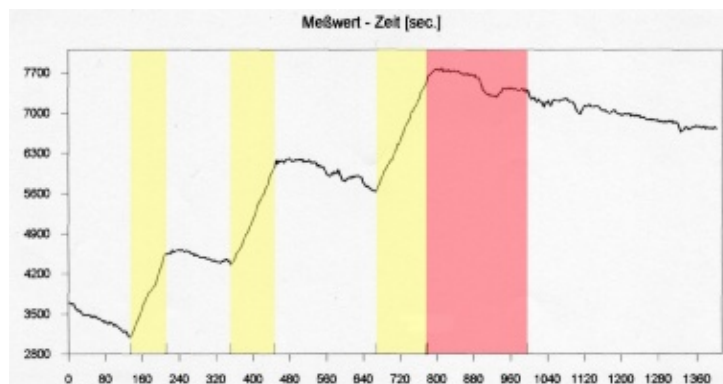
Ergebnisse und Diskussion

Die einzelnen Messdaten sind in Tab. 6 und in den nachfolgenden Graphen (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) dargestellt:

Tab. 6: Einzeldaten der 3 Sauerstoffmessungen. "Dunkel" entspricht der Restatmung, "Licht" der Photosynthese, und "Licht + DCMU" der Photosyntheserate nach Zugabe des Herbizids DCMU. Die Farbhinterlegung wurde mit den Graphen übereingestimmt.

Phase	Messung 1 ($\mu\text{mol O}_2 / \text{h}$)	Messung 2 ($\mu\text{mol O}_2 / \text{h}$)	Messung 3 ($\mu\text{mol O}_2 / \text{h}$)	Mittelwert M1+M3
1: Dunkel	-0,245	-0,213	-0,399	-0,3220
2: Licht	1,306	-0,026	1,388	1,3470
3: Dunkel	-0,195	-0,156	-0,216	-0,2055
4: Licht	1,359	-0,041	0,792	1,0755
5: Dunkel	-0,206	-0,137	-0,248	-0,2270
6: Licht	1,252		0,326	0,7890
7: Licht + DCMU	-0,166		-0,392	-0,2790
8: Dunkel	-0,103		-0,219	-0,1610

(a)



(b)

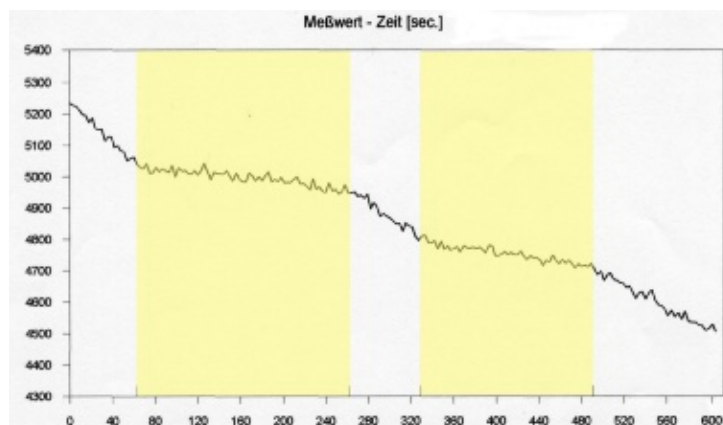


Abb. 27: Einzelgraphen der drei Messungen, Verlauf der Sauerstoffkonzentration (a = Messung 1, b = Messung 2, c = Messung 3). Lichtphasen sind gelb hinterlegt, die Lichtphase nach DCMU-Zugabe hellrot.

(c)

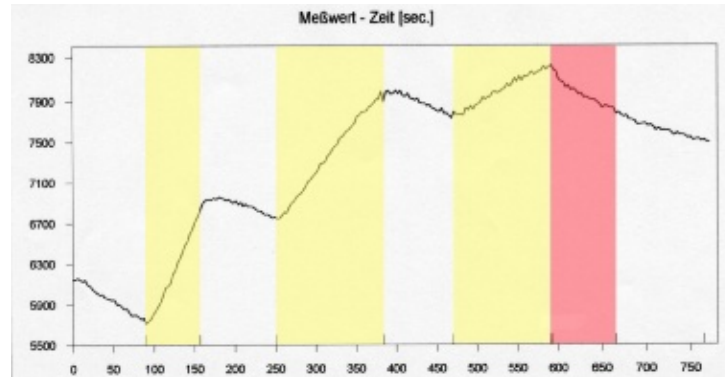


Abb. 27 (Fortsetzung): Einzelgraphen der drei Messungen, Verlauf der Sauerstoffkonzentration (a = Messung 1, b = Messung 2, c = Messung 3). Lichtphasen sind gelb hinterlegt, die Lichtphase nach DCMU-Zugabe hellrot.

Die signifikante Abnahme der Sauerstoffkonzentration in den Dunkelphasen ist nicht allein durch die "natürliche Drift" der O₂-Elektrode zu erklären. In der Chloroplastenlösung sind durch die Extraktionsmethode auch Mitochondrien enthalten, deren Atmung die Messungen in diesem Maß beeinflusst.

Außerdem konnte in den drei aufeinander folgenden Lichtphasen pro Messung eine schwächer werdende O₂-Produktion festgestellt werden, die darauf zurückzuführen ist, dass Chloroplasten nach und nach beschädigt oder gar zerstört wurden. In der Messkammer sind sie nicht so gut vor Stoffwechsel-Nebenprodukten und Enzymen geschützt wie in der intakten Pflanzenzelle.

Für die weitere Berechnung mussten diese Daten zunächst standardisiert werden ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Dazu dienten Spektrometrische Analysen (Extinktion bei 663 und 647 nm) der einzelnen Chloroplasten-Messlösungen 1-3 und die Chlorophyll-Quantifizierung nach der Formel von PORRA (1989):

$$\mu\text{g Chl(a u. b) / ml} = 7,34 \cdot E_{663} + 17,76 \cdot E_{647}$$

Tab. 7 zeigt die daraus errechneten Chlorophyllgehalte pro Probe. Das Volumen der Messkammer (1,6 ml) wurde in der Berechnung bereits berücksichtigt.

Tab. 7: Berechnung der Chlorophyllgehalte der einzelnen Proben.

	Probe 1 (M1)	Probe 2 (M2)	Probe 3 (M3)
E ₆₆₃	0,5732	0,5370	0,6998
E ₆₄₇	0,2571	0,2384	0,3273
mg Chlorophyll	0,014	0,013	0,018

Tab. 8: Standardisierte Einzeldaten der 3 Sauerstoffmessungen, Legende und Beschreibung laut Tab. 6.

Phase	M1 ($\mu\text{mol O}_2 / \text{h} \cdot \text{mg}$)	M2 ($\mu\text{mol O}_2 / \text{h} \cdot \text{mg}$)	M3 ($\mu\text{mol O}_2 / \text{h} \cdot \text{mg}$)	Mittelwert M1+M3
1: Dunkel	-17,453	-16,283	-22,775	-20,114
2: Licht	93,037	-1,988	79,228	86,133
3: Dunkel	-13,891	-11,926	-12,329	-13,110
4: Licht	96,813	-3,134	45,208	71,010
5: Dunkel	-14,675	-10,473	-14,156	-14,416
6: Licht	89,190		18,608	53,899
7: Licht +DCMU	-11,826		-22,376	-17,101
8: Dunkel	-7,338		-12,501	-9,919

Nachträgl. Anmerkung des Professors:
Phasen 4 und 6 in M3 nicht für die Auswertung verwenden – versuchsbedingte Abweichungen (Organell-Alterung)!

Zum Ermitteln der Brutto-Photosynthese (Netto-Produktion - Respiration; Tab. 9) wurde aus den Mittelwerten der Messungen 1 und 3 jeweils eine Lichtphase und die darauf folgende Dunkelphase herangezogen (Tab. 9).

Tab. 9: Berechnung der Brutto-Sauerstoffproduktion.

Phasen	Licht (Netto-Prod.) ($\mu\text{mol O}_2 / \text{h} \cdot \text{mg}$)	Dunkel (Respiration) ($\mu\text{mol O}_2 / \text{h} \cdot \text{mg}$)	Brutto-Produktion ($\mu\text{mol O}_2 / \text{h} \cdot \text{mg}$)
2+3	86,1327	-13,1105	99,2431
4+5	71,0104	-14,4156	85,4259
6+8	53,8993	-0,1610	54,0603

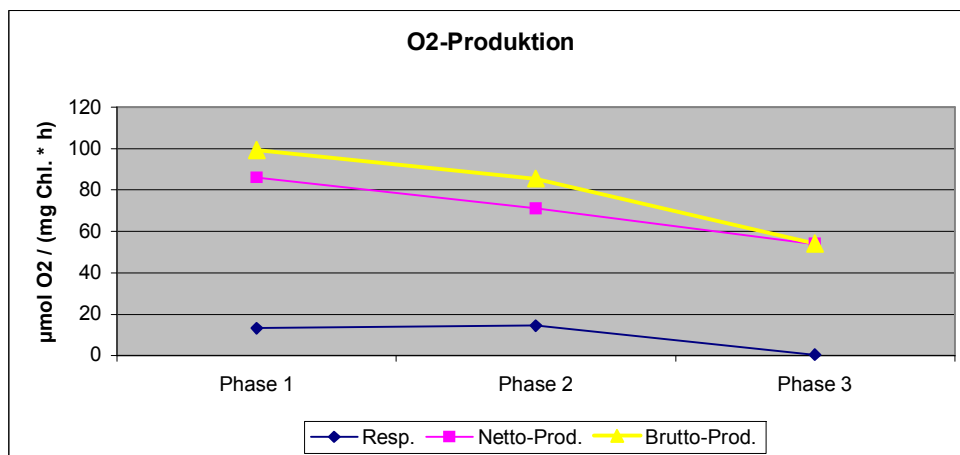


Abb. 28: Graphische Darstellung von Respiration (Resp.), Netto-Sauerstoffproduktion (Netto-Prod.) und daraus folgender Brutto-Sauerstoffproduktion (Brutto-Prod.).

Wirkungsgrad von DCMU

Bei Phase 7 (DCMU-Zugabe, M1 und M3) brach die Sauerstoffkurve sofort ein, und der Verlauf der O₂-Konzentration glich der einer Dunkelphase. Auch die Zahlenwerte sind eindeutig, es ergibt sich eine Herbizidwirkung von 100% verglichen mit der Kontrolle (Dunkelphase). Der Elektronentransport wurde durch DCMU also vollständig blockiert.

Durch die unplanmäßige Verwendung eines 10fach konzentrierten DCMU-Ansatzes im Vergleich zu den Angaben im Skriptum konnte der Verschluss der Messkammer nach M1 nicht vollständig von DCMU gereinigt werden. Das Resultat waren minimale Photosyntheseraten in Messung 2 (M2).

Trotzdem ist auch in M2 ein deutlicher Unterschied zwischen Licht- und Dunkelphase erkennbar. Im Vergleich mit den gemittelten Photosyntheseraten aus M1 und M3 ergeben sich bei M2 Raten von 10% und 8,6% bzw. Herbizidwirkungen von 90% und 91,4% gegenüber der Kontrolle.

Phasen	Licht ($\mu\text{mol O}_2 / \text{h} \cdot \text{mg}$)	Dunkel ($\mu\text{mol O}_2 / \text{h} \cdot \text{mg}$)	Brutto-Prod. M2 ($\mu\text{mol O}_2 / \text{h} \cdot \text{mg}$)	Brutto-Prod. M1+M3	Wirkungsgrad DCMU
2+3	-1,9876	-11,9258	9,9382	99,2431	90,0%
4+5	-3,1343	-10,4733	7,3389	85,4259	91,4%

Förderung und Hemmung der Abszission durch Phytohormone

Einleitung

Bei den folgenden Versuchen galt es die Wirkung der Wachstumsregulatoren Etephon sowie IES auf junge Pflanzen aufzuzeigen und zu beobachten.

a) Etephon

Material und Methoden

- Junge Bohnenpflanzen
- Etephon (2-Chlorethylphosphonsäure)
- Erlenmeyerkolben

Durchführung

Mit dem Etephon wird zuerst eine Verdünnungsreihe (siehe Tab. 10) aufgestellt, wobei je Konzentration 100 ml gebraucht werden. In diese in Erlenmeyerkolben abgefüllten Testlösungen werden jeweils etwa 3 junge Bohnenpflanzen, die über der Wurzel abgeschnitten werden gestellt, um über den Zeitraum der folgenden 8 Tage deren Reaktionen zu beobachten.

Tab. 10: Verwendete Mengen für die Verdünnungsreihe.

Konzentration	Grundlösung [ml]	Aqua dest [ml]
200,0 mg/l	50 mg Etephon in Ethanol vorgelöst	250
100,0 mg/l	50	50
50 mg/l	50	150
25 mg/l	50 ml von 50 mg/l	50
12,5 mg/l	25 ml von 50 mg/l	75
0 mg/l	0	100

Ergebnisse und Diskussion

Wir zählten die Anzahl der abgefallenen Blätter bereits nach 4 Tagen und stellten sie der Blatt-Gesamtanzahl der 3 Pflanzen je Konzentration gegenüber.

Wie erwartet führte die höchste Etephon-Konzentration zum schnellsten und stärksten Blattabwurf (über 80 % der Blätter verloren), bei geringen Konzentrationen konnte innerhalb des kurzen Zeitraumes kein Unterschied zum Ansatz in Aqua dest. festgestellt werden.

Da viele Blattstiele zum Zeitpunkt der Auszählung nur noch schwach mit der Pflanze verbunden waren und die Blätter schon bei minimalen Berührungen abfielen, beschlossen wir die Pflanzen zu schütteln um die Reaktion zu beschleunigen und sofort ein Ergebnis zu erhalten das dem eines etwas längerem Versuchszeitraums ähneln würde.

Tab. 11: Ergebnisse der Etephonbehandlung. Abwurf nat. = Natürlich abgefallene Blätter / Gesamtanzahl, Abwurf schüt. = Abgefallene Blätter nach Schütteln.

Konzentration	Abwurf nat.	Abwurf schüt.	%
200 mg/l	7/11	9/11	81,8%
100 mg/l	2/8	6/8	75,0%
50 mg/l	1/6	4/6	66,7%
25 mg/l	1/5	3/5	60,0%
12,5 mg/l	0/6	0/6	0,0%
0 mg/l	0/6	0/6	0,0%

Mögliche Fehlerquellen: Wichtig ist es, die Pflanzen unmittelbar nach dem Schnitt in die Lösung zu stellen, sowie einigen Abstand zwischen den Kolben mit verschiedenen Konzentrationen einzuhalten, um Verfälschungen durch das freigesetzte Ethylen und die möglicherweise darauf folgende Einwirkung auf benachbarte Pflanzen zu verhindern.



Abb. 29: Aufreihung aller Kolben nach 4 Tagen. Konzentrationen laut Tab. 11, v.l.n.r. abnehmend.

Mithilfe dieses Experiments wurde die schnelle und einfache Wirkung von (2-Chlorethyl)phosphonsäure gezeigt, das in der Landwirtschaft als Ethrel bzw. Ceron verkauft wird, wo es zur Erleichterung der mechanischen Ernte bei zahlreichen Pflanzen (z.B. Baumwolle) verwendet wird.

b) IES

Material und Methoden

- IES-Paste 0,2 % (Vorbereitet von Gruppe B)
- junge Bohnenpflanzen

Durchführung

Apikalknospen und Blattspreiten (ohne Stiele) von 6 Bohnenpflanzen wurden nach Erhalt der Lanolinpaste mit 0,2 % Indol-3-Essigsäure abgeschnitten, der austretende Saft abgetupft und die Paste auf die Stümpfe aufgetragen. Bei 3 der Pflanzen wurde zur Kontrolle eine nur aus Lanolin und Wasser bestehende Paste aufgetragen.

Ergebnisse und Diskussion

Noch in der selben Woche konnten erste Reaktionen beobachtet werden: Bereits nach 2 Tagen hatten sich die Blätter vom Spross weg gewunden (Abb. 30).



Abb. 30: Paste auf der Apikalknospe, links: Kurz nach dem Auftragen, rechts: Erste Windungen nach 2 Tagen.

Die endgültige Versuchsauswertung erfolgte aber erst 9 Tage nach dem Auftragen.

Das Auxin auf den Schnittflächen der Blattstiele bewirkte einen Abwurf des Stiels, da Auxine allgemein die Ausbildung von Trenngewebe induzieren. Es handelt sich also um aktiven Blattabwurf.

An den entfernten Apikalknospen bewirkte das Phytohormon Apikaldominanz, also die Hemmung von Seitenknospen. Bei den Kontrollpflanzen bewirkte das Entfernen der Apikalknospe ein Austreiben der Seitenknospen.

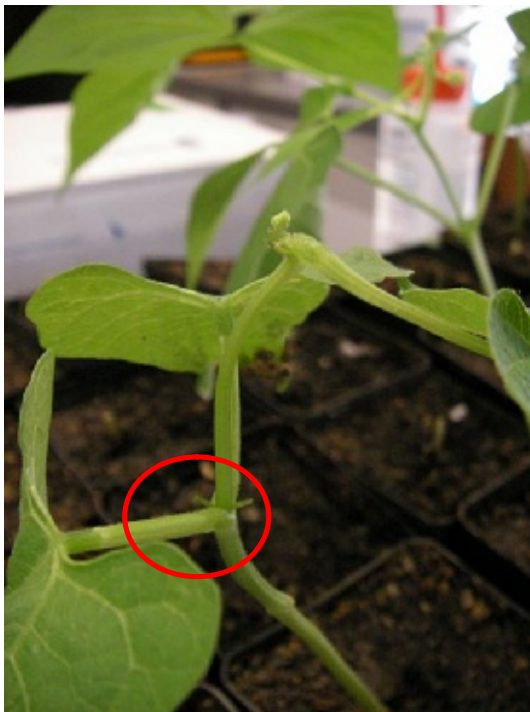


Abb. 31: IES ist verantwortlich für Apikaldominanz und unterdrückt die Bildung von Seitentrieben (links: Inaktive Seitenknospen, 9 Tage nach Entfernen der Apikalknospe; rechts: Kontrolle mit gut entwickeltem Seitentrieb).

Eine weitere Auswirkung war das Auftreten von Missbildungen wie Wucherungen und Verdickungen, die in Querschnitten unter dem Lichtmikroskop genauer betrachtet wurden. So fielen die chaotische Anordnung und das schwache Auftreten bis Fehlen von Chloroplasten besonders auf. Ein Querschnitt durch einen normalen unbehandelten Spross zeigte charakteristischen Aufbau mit planmäßiger Anordnung der Zellen, die ihre Funktion erfüllen.

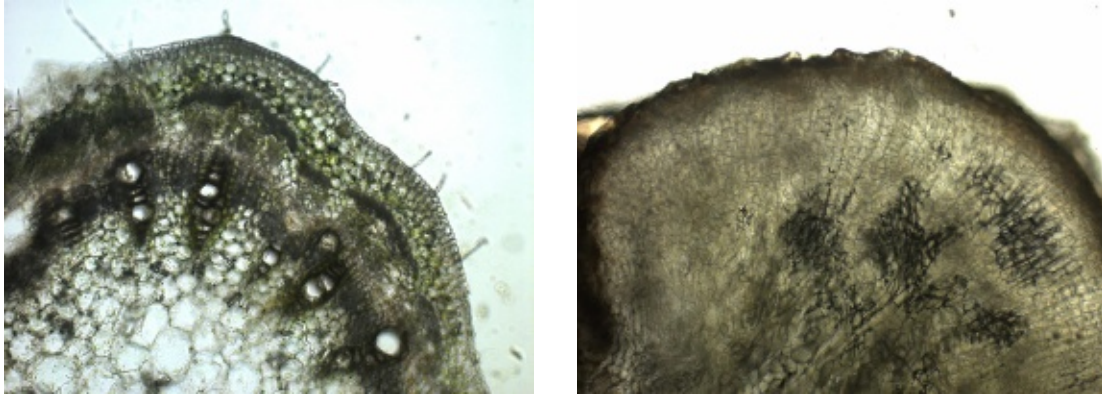


Abb. 32: Querschnitt eines unbehandelten Sprosses (links) und durch eine Wucherung (rechts).

c) Resultate der anderen Gruppen

α -Naphthyllessigsäure (Gruppe B)

Material und Methoden

- α -N-Paste 0,2 %
- junge Bohnenpflanzen

Durchführung

Als Testorganismen wurden insgesamt 8 Bohnenpflanzen (*Phaseolus vulgaris*) verwendet. Bei 2 Pflanzen wurde der apikale Stumpf, von weiteren 2 der Blattstiel mit Hormonpaste behandelt, 4 weitere entsprechend den vorigen mit Kontrollpaste. Bei 2 Pflanzen wurde zusätzlich etwas Hormonpaste seitlich am unverletzten Stiel aufgetragen.

Ergebnisse und Diskussion

Die seitlich am unverletzten Stiel aufgetragene Hormonpaste zeigte keinen Effekt. Die Versuchspflanzen könnten zu jung gewesen sein, bei älteren zeigen sich oft Wucherungen oder Wurzelbildung (vgl. Auxine zur Induktion der Adventivwurzelbildung an Stecklingen).

Bei den Pflanzen mit abgetrennter Apikalknospe waren die Neutriebe derjenigen, die mit Hormonpaste behandelt wurden, weniger entwickelt als jene der mit Kontrollpaste behandelten (Apikaldominanz, Hemmung der Seitentriebe).

Wo Hormonpaste auf abgestumpfte Blattstiele aufgetragen wurde, konnten kleine Wucherungen beobachtet werden, allerdings weniger markant als bei IES (Störung der Meristemabildung).

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (Gruppe C)

Material und Methoden

- 2,4-D-Paste 0,2 %
- Coleus-Pflanzen

Durchführung

Wie bei den vorigen Versuchen wurde auch hier die Wirkung eines Phytohormons in Lanolinpaste (in diesem Fall 2,4-D) auf einen Testorganismus untersucht: Die Paste wurde einerseits auf den unverletzten Stiel aufgetragen, andererseits auf Blattstielen (Blattspreite entfernt) und auf die Stelle, an der zuvor die Apikalknospe entfernt wurde – jeweils mit Kontrollpflanze (Lanolin ohne 2,4-D).

Ergebnisse und Diskussion

Die seitlich am unverletzten Stiel aufgetragene Hormonpaste zeigte wie auch bei den vorigen Experimenten keinen Effekt. Das zu erwartende Streckungswachstum, eine der Wirkungen von Auxinen, ist nicht eingetreten.

Beim apikalen Einsatz ersetzte die Paste das natürliche (kurz zuvor entfernte) Auxin-Produktionszentrum und hinderte erfolgreich das Austreiben der Seitenknospen im Vergleich zur Kontrolle.

An den Blattstielen hatte die Hormonpaste zur Wirkung, dass die Stielenden einerseits stark vergrößert und aufgequollen waren, andererseits ihre grüne Färbung teilweise verloren hatten.



Abb. 33: Blattstiele bei Hormonbehandlung (links) und Kontrolle (rechts).
Foto: Ines Bauer

Lichtmikroskopische Schnitte ergaben Unterschiede im Gewebe: Die Zellen der behandelten Stiele waren verformt, kompakter gepackt, und hatten eine stark reduzierte Anzahl an Chloroplasten.

Wirkung von Gibberellinen auf das Wachstum des Hypocotyls (Gruppe C)

Material und Methoden

- 120 Samen von *Lactuca sativa*
- Gibberellinsäure-Lösungen in den Konzentrationen 1 mM, 1 μ M, 100, 10 und 1 nM

Durchführung

In 6 Petrischalen wurden je 3 Rundfilter gegeben, darauf wiederum je 20 Samen von *Lactuca sativa*, die mit A. dest. auf der Fensterbank zum Keimen gebracht wurden. Nach zwei Tagen wurden ungekeimte Samen und zu große Keimlinge entfernt, um für den Versuch nur passende Keimlinge mit annähernd gleicher Wurzellänge zu erhalten.

Anschließend wurde mit saufähigem Papier das restliche A. dest. abgesaugt und durch die Hormonlösung in den verschiedenen Konzentrationen ersetzt. Die Petrischalen wurden bei Dunkelheit und Raumtemperatur weiter inkubiert. Nach 7 weiteren Tagen wurden die Keimlinge vermessen, und die Hypocotyl-Längen bei den verschiedenen Konzentrationen verglichen.

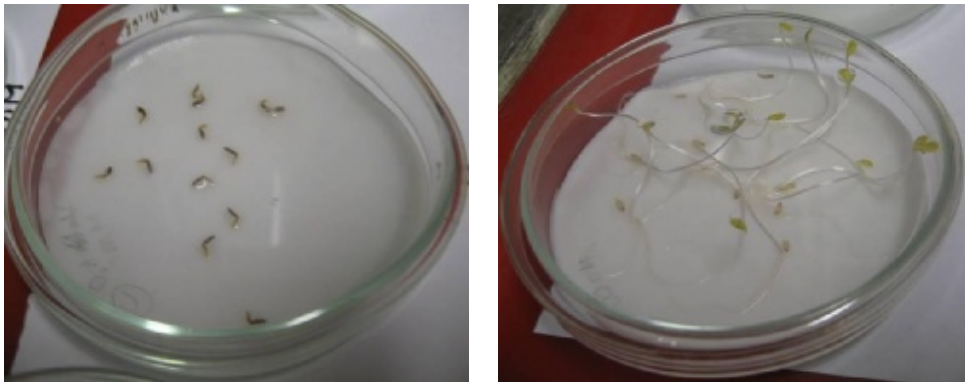


Abb. 34: Beispielfotos aus dem Gibberellin-Versuch mit den Konzentrationen 1 mM (links) und 100 nM (rechts). Fotos: Ines Bauer

Ergebnisse und Diskussion

Die Wirkung der Gibberellinsäure wird in Abb. 35 veranschaulicht, Einzelmesswerte sind in Tab. 12 zu finden.

Tab. 12: Einzelmesswerte aus dem quantitativen Gibberellin-Versuch

Konzentration	A. dest	1 nM	10 nM	100 nM	1 μ M	1 mM
	6,0	7,3	7,7	9,5	5,1	4,0
	6,4	8,1	8,9	10,0	5,8	3,0
	5,4	7,3	6,5	8,5	6,8	3,0
	5,7	9,1	8,3	9,4	7,1	4,0
	7,8	7,7	8,4	9,8	4,6	3,0
	4,2	7,5	8,1	9,0	5,5	3,0
	7,1	5,3	6,2	9,2	4,9	3,0
	5,7	9,2	8,8	8,5	5,4	4,0
	7,0	7,7	9,4	7,7	5,8	4,0
	7,0	7,3	8,3	8,0	5,0	2,0
	6,1	8,2		9,8	5,4	3,0
		7,6		8,2		3,0
Mittelwert	6,2	7,7	8,1	9,0	5,6	3,2

Gibberelline fördern im Allgemeinen das Zellwachstum und Streckungswachstum, und beeinflussen u.a. die Speicherstoffmobilisierung, und die Geschlechtsdifferenzierung der männlichen Blüten bei Rosettenpflanzen.

Im vorliegenden Versuch erzielte eine Konzentration von 100 nM die besten Resultate, mit einer Steigerung des Hypocotylwachstums um 45 %. Höhere Konzentrationen bewirkten hingegen eine deutliche Wachstumshemmung.

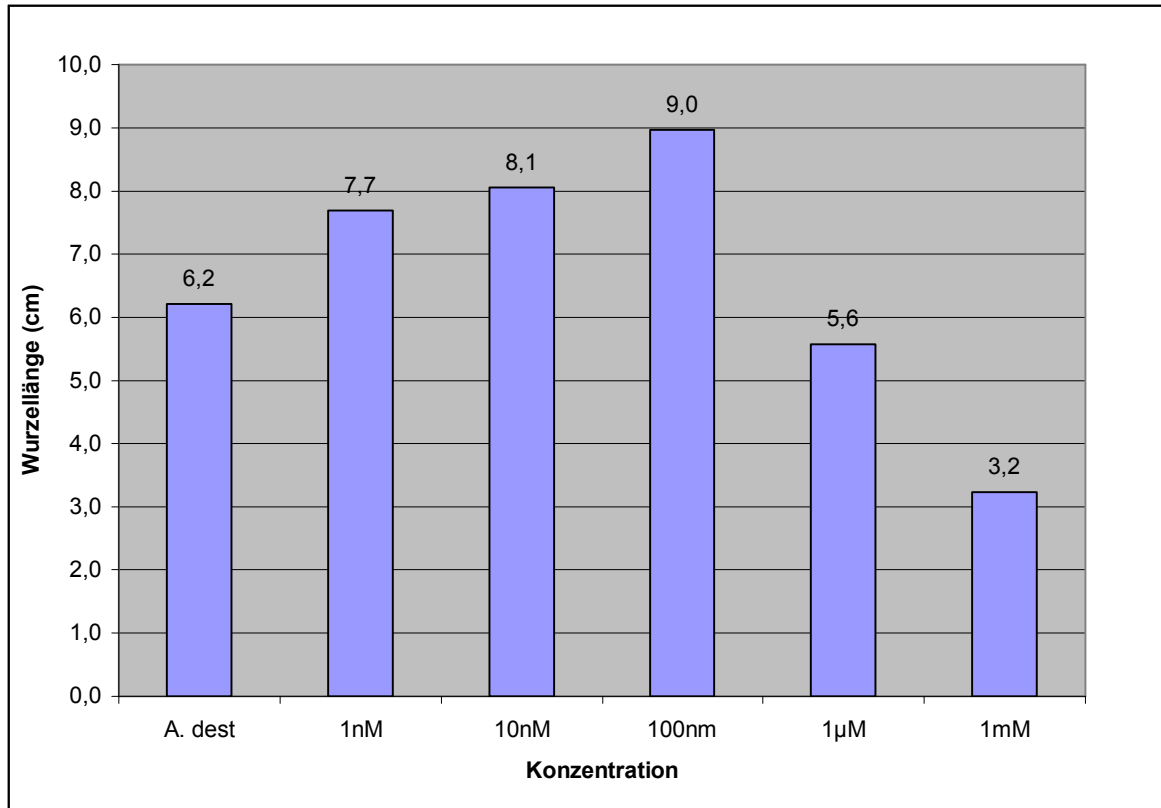


Abb. 35: Wurzellängen in cm bei verschiedenen Gibberellinsäure-Konzentrationen.