



**“Einfluss von Ozon
auf *Trifolium
repens*:
Ableitung von
Dosis-Wirkung-
Beziehungen und
Ursachen
der
unterschiedlichen
Empfindlichkeit,**



**"Einfluss von Ozon auf *Trifolium repens*:
Ableitung von Dosis-Wirkung-Beziehungen und Ursachen
der unterschiedlichen Empfindlichkeit"**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Meropi Gavriilidou

D26

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Mayer

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Hans-Jürgen Jäger

2. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Fangmeier

Giessen, im Februar 2006

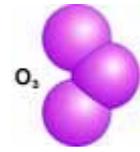
An
Jannis und Ilias

INHALTSVERZEICHNISS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Eigenschaften und Vorkommen von Ozon	1
1.2 Austausch von Ozon zwischen bodennaher Atmosphäre und Vegetation	3
1.3 Auswirkungen auf die Vegetation	4
1.4 Konzepte zur Ableitung von Richtwerten zum Schutz der Vegetation	10
1.5 Zielsetzung	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Kultur und Exposition der Versuchspflanzen	14
2.2 Berechnung des Ozonaustausches zwischen dem Modell-System "Klee" und der bodennahen Atmosphäre	18
2.3 Wirkungserhebungen	23
2.3.1 Symptomatologie	23
2.3.2 Ertrag	24
2.3.3 <i>Leaf Area Index</i>	25
2.3.4 Wasserverbrauch	25
2.3.5 Gaswechsel	25
2.3.6 Stoffwechselfparameter	26
2.3.7 Apoplasten-Fluid	31
2.3.8 Blattanatomie	31
2.4 Datenauswertung und Statistik	33
3. ERGEBNISSE	35
3.1 Klimatische Bedingungen und Ozonexposition	35
3.2 Einfluß von O ₃ auf die Produktion oberirdischer Biomasse	37
3.2.1 Ertragserhebungen im Freiland	37
3.2.2 Ertragserhebungen in den <i>open-top</i> -Kammern	43

3.3 Abhängigkeit des Biomasseverhältnisses der beiden Klone von der Ozonbelastung im Freiland	46
3.4 Ableitung einer Fluss-Wirkung-Beziehung für das Auftreten erster sichtbarer Schadsymptome	48
3.4.1 Modellparametrisierung	48
3.4.1.1 Entwicklung des <i>Leaf Area Index</i>	49
3.4.1.2 Entwicklung der Bestandeshöhe	52
3.4.1.3 Albedo	52
3.4.1.4 Stomataverhalten	54
3.4.1.5 Evaporation von unbewachsenen Boden	59
3.4.1.6 Evapotranspiration	61
3.4.2 Berechnung der <i>pollutant absorbed dose</i> (PAD)	64
3.4.3 Gegenüberstellung von PAD und AOT40-Werten	67
3.5 Untersuchungen zu den Ursachen der unterschiedlichen O₃-Empfindlichkeit der Kleeklone	68
3.5.1 Stoffwechselfparameter	68
3.5.1.1 Gesamtblatt	68
3.5.1.2 Apoplastenfluid	76
3.5.2 Blattanatomie	87
4. DISKUSSION	97
4.1 Ableitung von Fluss-Wirkung-Beziehungen	97
4.2 Untersuchungen zur O₃ Sensitivität zweier Klone von <i>Trifolium repens</i> cv. Regal	105
5. ZUSAMMENFASSUNG	113
6. LITERATURVERZEICHNISS	114
DANKSAGUNG	
ANHANG	

1. EINLEITUNG



1.1 Eigenschaften und Vorkommen von Ozon

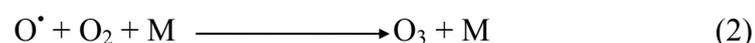
Ozon besteht aus drei Sauerstoffatomen und ist bei Raumtemperatur ein blaues, schlecht wasserlösliches Gas. Sein Name leitet sich aus dem griechischen Wort für „das Riechende“ ab. Bereits in sehr hoher Verdünnung wird Ozon wahrgenommen. Christian F. Schönbein entdeckte 1839 das Gas bei der Elektrolyse von Wasser und benannte es wegen seines stechenden Geruchs entsprechend. Da Ozon sehr leicht ein Sauerstoffatom abgibt, gilt es als eines der stärksten Oxidationsmittel, welches besonders mit ungesättigten organischen Verbindungen reagiert (KLEY et al., 1999).

Ozon kommt natürlich in unserer Atmosphäre vor. Etwa 90 % des atmosphärischen Ozons befinden sich in der Stratosphäre (10-50 km Höhe) und schützt die Erde vor schädlicher UV-Strahlung. Die restlichen 10 % kommen in der Troposphäre (die untersten 10 km der Atmosphäre) vor und wirken als Schadgas. Im Gegensatz zum bekannten Ozonabbau in der Stratosphäre ("Ozonloch") findet in der Troposphäre ein kontinuierlicher Zuwachs statt. Troposphärisches Ozon war schon immer präsent, doch die großen industriellen Entwicklungen riefen den anthropogen beeinflussten Anstieg der O₃-Konzentration hervor (LEFOHN, 1991). Bezogen auf die letzten Jahrzehnte ergab sich eine exponentielle Zunahme von Ozon um 1,6 % bis 2,4 % pro Jahr (MARENCO et al., 1994). Das troposphärische Ozon ist Bestandteil des photochemischen Smogs, der auch als oxidierender Smog bezeichnet wird, und entsteht zum einen durch Abwärtsbewegungen der stratosphärischen Luft in die Troposphäre, wobei der Austausch über die Tropopause im Durchschnitt langsam ist (GUDERIAN, 1985), und zum anderen durch photochemische Reaktionen bzw. durch Wechselwirkungen von Stickstoffoxiden (NO_x), Kohlenmonoxid und Kohlenwasserstoffen unter Katalyse energiereicher UV-Strahlung.

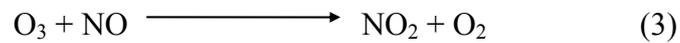
Als Anfangsschritt der Ozonbildung wird die Photolyse des NO₂ (bei $\lambda < 410$ nm) betrachtet (1):



Es entsteht Stickstoffmonoxid (NO) und atomarer Sauerstoff (O[•]). Das Sauerstoffradikal (O[•]), das aus der Photolyse des NO₂ freigesetzt wird, bindet mit molekularem Sauerstoff (O₂), wodurch Ozon (O₃) entsteht (2):



Mit M werden alle Stoßpartner bezeichnet, wie z.B. Staubpartikel usw. Neben der Bildung findet gleichzeitig auch der Abbau des Ozons statt. Die wesentliche Senke für Ozon in sauberer Luft ist die Oxidation von NO (3). Die Ozonkonzentration ist demnach das Ergebnis zweier gegenläufiger Reaktionen, von denen die Bildung nur bei ausreichendem Sonnenschein und der Zerfall ständig abläuft.



In der unbelasteten Atmosphäre sind die Quellen von Stickstoffoxiden Blitze, mikrobielle Tätigkeiten im Boden und Wald- bzw. Buschbrände. Emittiertes NO reagiert mit dem Luftsauerstoff unter Bildung von NO₂. In den kleinen natürlichen Konzentrationen verläuft diese Reaktion ausserordentlich langsam. In stark belasteten Atmosphären findet man NO-Konzentrationen, die im Jahresmittel bis zu 10⁵mal so hoch sind wie die natürlichen, so dass auch die Bildung von NO₂ bis zu 10¹⁰mal so schnell verläuft. Für die NO₂-Bildung ist in den verschmutzten Atmosphären das Vorhandensein von erheblichen Kohlenwasserstoffkonzentrationen (VOC) von großer Bedeutung. Komplexe Reaktionsketten haben zur Folge, dass Ozon sich stark in der Troposphäre anreichern kann. Zu Einzelheiten der Ozonchemie siehe z.B. MÖLLER (2003).

Abhängig von der geographischen Lage verläuft der Abbau des Ozons in den Abendstunden unterschiedlich. Da Stickstoffoxide zu 90 % als NO vom Autoverkehr emittiert werden (KESSELMEIER & STAUDT, 2000) sind aufgrund des hohen NO-Gehaltes in den Innenstädten die Ozonkonzentrationen durch den Ozonabbau niedriger als in ländlichen Gebieten. Wegen der geringen NO-Konzentrationen in Waldgebieten und ländlichen Gegenden - durch den geringeren Kraftfahrzeugverkehr - zeigen diese die höchste Ozonbelastung, da das Ozon nicht abgebaut werden kann (ALTSHULER et al., 1995; PRYOR & STEYN, 1995; LVA ESSEN, 1997). So kommt es vor, dass in ländlichen Gebieten tagsüber zwar häufig niedrige Spitzenkonzentrationen gemessen werden, jedoch aufgrund des geringeren Ozonabbaus nachts die Werte auf einem relativ hohen Niveau verbleiben. In einigen Regionen sind die durchschnittlichen Ozonkonzentrationen an den Wochenenden sogar höher als an den Wochentagen. Für die hohen Ozongehalte in den Höhenlagen ist zudem die dort stärkere Strahlungsintensität verantwortlich. Neben der Konzentration der Vorläuferstoffe bestimmt also auch die Intensität der Sonneneinstrahlung das Ausmaß der Ozonbildung. Dies erklärt den ausgeprägten Tages- und Jahresgang der Ozonwerte. Somit ist die lokale Ozonkonzentration abhängig von der geographischen Lage und den meteorologischen Bedingungen, die in den untersuchten Gebieten herrschen (CAPE & UNSWORTH, 1988; KRUPA & KICKERT, 1992; FLAUM et al., 1996).

1.2 Austausch von Ozon zwischen bodennaher Atmosphäre und Vegetation

Der Austausch von Ozon zwischen bodennaher Atmosphäre und Vegetation ($F_{\text{total}}(\text{O}_3)$) wird über eine komplexe Interaktion meteorologischer und biologischer Eigenschaften kontrolliert (SEHMEL, 1980; RONECKLES, 1992). Die über die Stomata und die Kutikula absorbierten Ozonmengen ($F_{\text{absorbiert}}(\text{O}_3)$) stellen nur ein Teil des ausgetauschten Ozons dar. Weitere Senken sind die externen Pflanzenoberflächen ($F_{\text{externePflanzenoberflächen}}(\text{O}_3)$) und der Boden ($F_{\text{Boden}}(\text{O}_3)$)(Gleichung 4).

$$F_{\text{total}}(\text{O}_3) = F_{\text{absorbiert}}(\text{O}_3) + F_{\text{externePflanzenoberflächen}}(\text{O}_3) + F_{\text{Boden}}(\text{O}_3) \quad (4)$$

Ozon wird überwiegend durch die Stomata aufgenommen, da die Kutikula nur wenig durchlässig für O_3 ist (CAPE & UNSWORTH, 1998; RONECKLES, 1992; KERSTIENS et al., 1992). Der Fluss eines Gases ist abhängig vom Konzentrationsgefälle zwischen der Atmosphäre und dem Blattinneren entlang des Diffusionsweges. Damit kommt der stomatären Leitfähigkeit bzw. dem stomatären Transportwiderstand (dieser ist abhängig von der Anzahl, der Größe, der Öffnungsweite und der Anordnung der Stomata) die wesentliche Bedeutung für die Ozonaufnahme zu. Es wird angenommen, dass es Senken innerhalb der Pflanzen gibt, welche die Ozonkonzentration im Blattgewebe auf annähernd Null reduzieren (LAISK et al., 1989; WANG et al., 1995). Jede Wirkung von O_3 im pflanzlichen Organismus ist also eine Funktion der über die Spaltöffnungen absorbierten Schadstoffmenge. Von entscheidender Bedeutung sind dabei die atmosphärische Turbulenz und die damit verbundenen Transporteigenschaften der Atmosphäre. Der Gasfluss zur Oberfläche eines einzelnen Blattes wird weiterhin durch den laminaren Grenzschichtwiderstand beeinflusst, der eine Funktion von Blatteigenschaften (Größe, Form, Epidermisstruktur, Behaarung) und der Windgeschwindigkeit ist.

Das einfachste Modell, welches den Ozonaustausch zwischen Bestand und bodennaher Atmosphäre beschreibt, ist in der Literatur als das *big-leaf*-Modell bekannt. In diesem Widerstandsmodell (Abb. 1) wird anstelle des Bestandes ein einziges großes Blatt angenommen, das die Eigenschaften des gesamten Bestandes aufweist. Dabei wird davon ausgegangen, dass sich die vertikale Senkenverteilung von Ozon in einem Pflanzenbestand durch eine einzige Senke an der Oberfläche des *big-leaf* repräsentieren lässt. Eine ausführliche Darstellung dieses Konzeptes findet sich in GRÜNHAGE & HAENEL (1997, 2000) sowie in GRÜNHAGE et al. (2000).

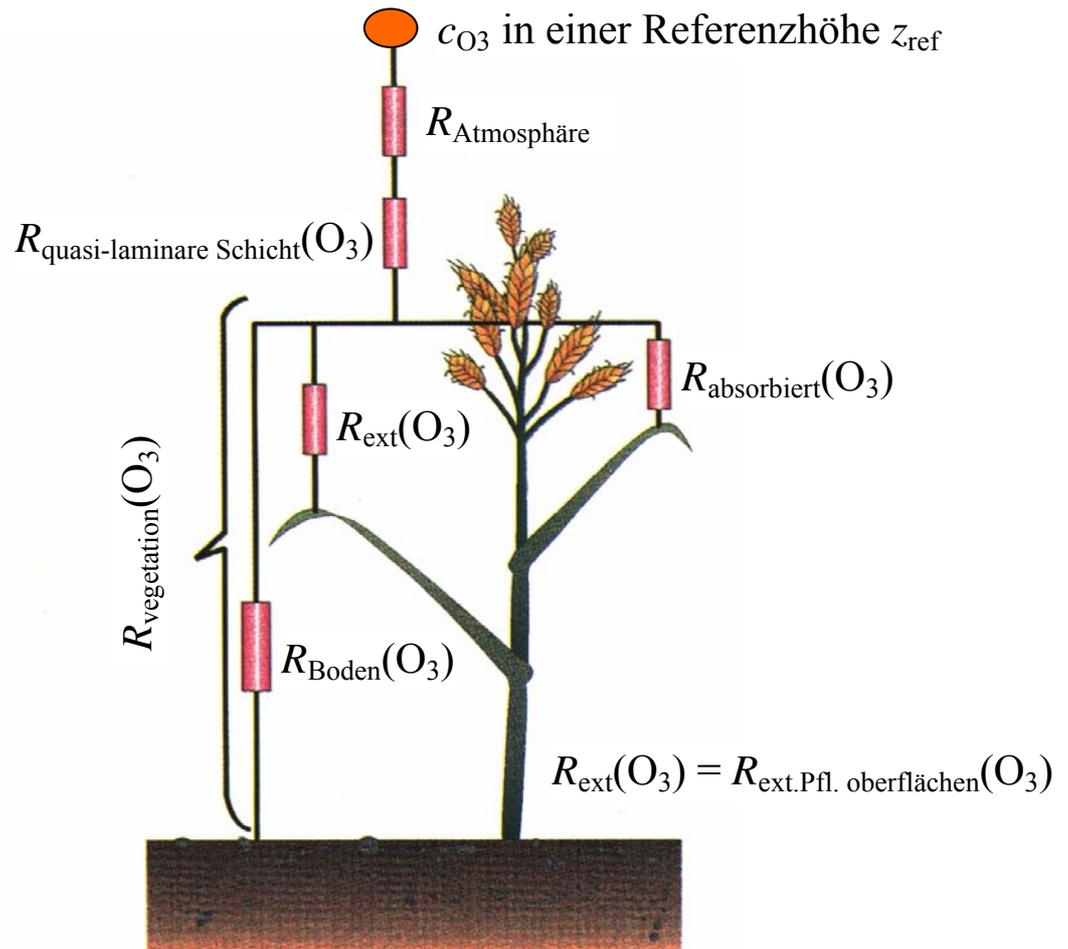


Abb. 1: Analogiemodell der Widerstände für Ozon im *big-leaf*-Modell (aus GRÜNHAGE et al., 2001; modifiziert nach PORG, 1997) c_{O_3} = Ozonkonzentration in einer Referenzhöhe z_{ref} ; R= alle beteiligte Widerstände; ext. Pfl.= externe Pflanzenoberflächen

1.3 Auswirkungen auf die Vegetation

Als Orte einer O_3 -Wirkung kommen die Blattoberfläche und das Blattinnere in Frage, wobei folgende Prozesse ablaufen können (RUNECKLES, 1992):

- Sorption und Reaktion an der Oberfläche der Kutikula
- Durchtritt durch die Kutikula in die darunterliegenden Zellschichten (Epidermis)
- Reaktion in den Epidermiszellen oder Passage in das Blattinnere
- Diffusion durch die Spaltöffnungen in die substomatären Atemhöhlen
- Reaktionen mit anderen Gasen in der substomatären Atemhöhle sowie in weiteren interzellularen Lufträumen

- Lösung in der Flüssigphase und Reaktion an der Oberfläche der den interzellularen Lufträumen angrenzenden Epidermis- und Mesophyllzellen
- Diffusion von Ozon und seiner Reaktionsprodukte durch die Interzellularräume zwischen den Mesophyllzellen
- Eindringen des Ozons oder seiner Reaktionsprodukte durch die Zellwand und Reaktion mit Zellmembranen
- Eindringen des Ozons oder seiner Reaktionsprodukte durch die Zellmembran ins Zellinnere bzw. in die Organellen (Zellkern, Chloroplasten, Mitochondrien, Vakuole).

Die ersten Studien über Auswirkungen des Ozons auf Pflanzen stammen aus den 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts (RICHARDS et al., 1958; THOMAS, 1961). Länger anhaltende Einwirkungen von niedrigen Ozonkonzentrationen führen meistens zu Chlorosen an den Blättern und zu morphologischen Veränderungen wie Zwergwuchs, Verkrümmungen und Blattepinastien (MANNING & TIEDEMANN, 1995). Der Verlauf dieser Vorgänge entspricht oft natürlichen Alterungserscheinungen der Pflanzen, so dass man auch von verfrühter Seneszenz spricht. Es werden auch sog. "Wasserflecken" auf Blättern beschrieben, die sich später in Nekrosen umwandeln (HEGGESTAD, 1991; SCHRAUDNER et al., 1996). Bei niedrigeren Ozonkonzentrationen kommt es zu einer Verminderung der Photosynthese (FANGMEIER et al., 1993; GUIDI et al., 1997; CLARK et al., 2000) durch vorzeitiges Schließen der Stomata und somit zu einer niedrigeren Produktivität (HEATH, 1994). Bei hoher Ozonkonzentration bzw. infolge hoher Aufnahmeraten von Ozon entstehen punktförmige (Abb. 2) oder flächenhafte Nekrosen (OJANPERÄ et al., 1992; SANDELIUS et al., 1995; BENDER & WEIGEL, 1995; BRÄUNING, 2002).



Abb. 2: Punktförmige Nekrosen infolge Ozoneinwirkung an einem sensitiven Klon von *Trifolium repens* cv. Regal (Weißklee)

Trotz langjähriger Forschung zur Wirkung von Ozon auf biologische Organismen sind die biochemischen Grundlagen noch nicht eindeutig geklärt (MUDD, 1996). Als primärer Wirkort des Ozons wird der Apoplast beschrieben (ELSTNER & OSSWALD, 1994; SAKURAI, 1998), denn nach der Aufnahme durch die Stomata zerfällt es zu über 95% im Apoplasten (DIERKESMANN & SANDERMANN, 2000). Während des Lösungsvorganges im Blattinneren findet eine Protonierung statt. Zudem werden Hydroxylionen (OH^-) freigesetzt, die den pH-Wert des Zellwandwassers erhöhen. Dadurch wird die Reaktivität des Ozons zusätzlich verstärkt (HEATH, 1987). Letztendlich wird durch eine Radikalspaltungsreaktion mit Wasser, Karbonsäuren, Alkoholen und anderen Verbindungen die Bildung von Hydroxyl- (OH^\bullet) und Peroxylradikalen (OH_2^\bullet , H_2O_2) induziert, die reaktiver als Ozon selbst sind (JÄGER et al., 1986; HEATH & CASTILLO, 1988). Es entstehen reaktive Sauerstoffspezies, die sogenannten ROS (*reactive oxygen species*) (RUNECKLES & VAARTNOU, 1997), wie auch das Superoxidanion (O_2^-), das Hydroperoxylradikal (HO_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dies bedeutet, dass nicht nur das Ozonmolekül toxisch wirkt, sondern auch seine Folgeprodukte.

Ozon greift die Plasmamembran an (GUDERIAN et al., 1985; RUNECKLES & CHEVONE, 1992; TOKARSKA-SCHLATTNER et al., 1997) und erhöht ihre Permeabilität (MUDD et al., 1984; MÄCHLER et al., 1995). Es beeinflusst die Pumpen der Plasmamembranen, ihre Transportproteine und ihre Viskosität und führt damit zur Störung des Pflanzenstoffwechsels (HEATH & CASTILLO, 1988). Infolge dieser Schäden wurden gesteigerte Respirationsraten gemessen (SHARMA & DAVIS, 1994). In den Chloroplasten wird zunächst das Chloroplastenstroma geschädigt, danach brechen die Membransysteme zusammen (MAGUHN et al., 1994). Ozon kann auch andere Proteinen schädigen (PACIFICI & DAVIES, 1990; MUDD, 1997). Dabei greift es die Sulfhydrylgruppen regulatorischer Proteine an und beeinträchtigt ihre Funktion (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; MUDD, 1997). Über Addition eines Ozonmoleküls an Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren der Membranlipide entsteht (Ozonolyse, MEHLHORN et al., 1990) ein Ozonid, das zunächst in ein Aldehyd bzw. Keton und in ein Criegee-Zwitterion ($-\text{C}^+ - \text{O} - \text{O}^- \leftrightarrow >\text{C}=\text{O}^+ - \text{O}^-$) und im nächsten Schritt unter Wasserzugabe in eine weitere Carbonylverbindung und H_2O_2 zerfällt (MUDD, 1982; HEATH, 1987; HIPPELI & ELSTNER, 1996). Durch diese Lipidperoxidation kommt es zur einer beschleunigten Seneszenz.

Organismen haben eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um ROS zu detoxifizieren. Zu diesen Mechanismen gehört das antioxidative System der Pflanzen, das über eine Kette von Antioxidantien verfügt, wie Ascorbinsäure (POLLE et al., 1995; CONKLIN et al., 1996), Glutathion (MEISTER & ANDERSON, 1983; ALSCHER, 1989; FOYER et al., 1997), α -Tocopherol (MCCAY, 1985; PACKER et al., 2001), Mannitol (SHEN et al., 1997), Phenole (RICE-EVANS et al., 1997; HAGERMANN et al., 1998), Karotinoide, Polyamine und Flavonoide, (ROBAK & GRYGLEWSKI, 1988; RICE-EVANS et al., 1996) sowie eine Reihe von Enzymen wie Peroxidasen (Ascorbatperoxidase, Glutathionperoxidase, un-

spezifische Peroxidasen), Reduktasen (Glutathionreduktase, Dehydroascorbatreduktase), Katalase und die Superoxiddismutase (ASADA, 1992; USHIMARU et al., 1997; FISHER et al., 2000). Wenn die Pflanze zur Entgiftung und Reparatur nicht mehr in der Lage ist, kommt es zur Anreicherung von biochemischen Substanzen wie z.B. von Malonsäuredialdehyd, das aus der oxidativen Spaltung der ungesättigten Fettsäuren der Biomembranen stammt (HEATH, 1975; MACKERNES et al., 1999).

Viele Untersuchungen in den letzten Jahren haben gezeigt, dass Ascorbat eine signifikante Rolle bei der Detoxifikation von Ozon spielt (SMIRNOFF & WHEELER, 2000). Allerdings gibt es unterschiedliche Ergebnisse in der Literatur. Es gibt sowohl Angaben über erhöhte Ascorbatkonzentrationen nach Ozoneinwirkung als auch unveränderte oder sogar verminderte Ascorbatmengen (BENDER et al., 1994; LYONS et al., 1999; ZHENG et al., 2000; BRÄUNING, 2002). Bei Untersuchungen, in denen die Ascorbatkonzentration verändert wurde, führte dieser Eingriff zu Unterschieden in der Ozontoleranz der Pflanzen. Je mehr vorhanden war, desto größer war der Schutz, den die Pflanze aufwies (MÄCHLER et al., 1995; ZHENG et al., 2000). Steht weniger zur Verfügung, so ist die betroffene Pflanze sensitiver (MOLDAU, 1998). Bei Mutanten der Art *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand), die nicht in der Lage sind, selbst Ascorbat zu produzieren, ist die Ozonsensitivität auffällig hoch (CONKLIN et al., 1996).

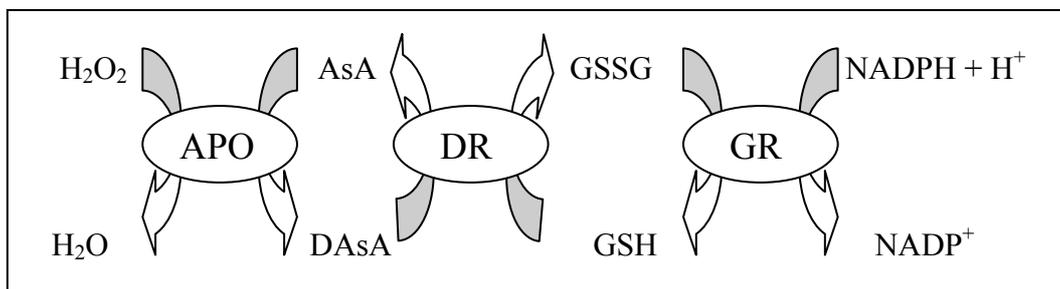


Abb. 3: Schematische Darstellung des Ascorbat-Glutathion-Systems

(APO = Ascorbatperoxidase; AsA, D-AsA = reduzierte bzw. oxidierte Ascorbinsäure; DR=Dehydroascorbatreduktase; GSH, GSSG= reduziertes bzw. oxidiertes Glutathion; GR=Glutathionreduktase; NADPH+H⁺, NADP⁺= reduzierte bzw. oxidierte Form)

Die bekannteste Entgiftungsreaktion ist die des Ascorbat-Glutathion-Systems (Abb. 3), welches sich u.a. in den Chloroplasten befindet (FOYER & HALLIWELL, 1976). Reduziertes Ascorbat entgiftet H₂O₂ mit Hilfe der Ascorbatperoxidase, wobei Dehydroascorbat und Wasser entstehen. Im nächsten Schritt wird mit Hilfe der glutathionabhängigen Dehydroascorbatreduktase das Ascorbat neu regeneriert. Die oxidierte Form des Glutathions wird durch die Glutathionreduktase auf Kosten von NADPH+H⁺ wieder in die reduzierte Form überführt (LAW et al., 1983). So wird in den Chloroplasten Ascorbinsäure durch NADPH und GSH wieder regeneriert, so dass es kontinuierlich zur Ver-

fügung steht. Das Ascorbat / Dehydroascorbat-Verhältnis gilt als Indikator für den Grad der Stresseinwirkung auf eine Pflanze (KAMPFENKEL et al., 1995).

In letzter Zeit gewinnt der Ascorbat-*Pool*, der sich im Apoplasten befindet und als erster die "Verteidigung" gegen das Ozon übernimmt, großes Interesse. Es gibt einige Gründe, die dafür sprechen, dass das Ascorbat im Apoplasten eine grosse Rolle spielt:

- (1) Es ist der erste Ort, wo das Ozon und die ROS entgiftet werden können.
- (2) Die Konzentration des Ascorbats in den Apoplasten ist relativ hoch und liegt bei 0,01-4,00 mmol/l (LUWE et al., 1993; POLLE et al., 1995; KOLLIST et al., 1996; LUWE, 1996).
- (3) Die Menge des apoplastischen Ascorbats ist umgekehrt proportional zur Schädigung des Blattes, wie von LUWE et al. (1993) und KELLY et al. (1995) gezeigt werden konnte.

Zahlreiche Untersuchungen belegen die Detoxifikation des Ozons im Apoplasten (LUWE & HEBER, 1995; RANIERI et al., 1999; TURCSANYI et al., 2000; BRÄUNING, 2002). Unter Normalbedingungen liegt 80-90 % des Ascorbats in der reduzierten Form vor. Allerdings konnte nach einer Ozonbehandlung bis zu 90 % des Ascorbats in der oxidierten Form nachgewiesen werden (LUWE & HEBER, 1995). Die schnelle Änderung der apoplastischen Ascorbatkonzentration unter Stressbedingungen (CASTILLO & GREPPIN; 1998; PETERS et al., 1989) oder die strenge Regulation der Ascorbatkonzentration in speziellen Zellkompartimenten (DOULIS et al., 1997) weisen auf die Anwesenheit von speziellen regulatorischen Transportsystemen in den pflanzlichen Zellmembranen hin. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der Transport von Ascorbat mittels spezieller Carrier erfolgt (TAKAHAMA, 1998; HOREMANS et al., 2000). Allerdings kann der Transport von Ascorbat vom Cytosol in den Apoplasten auch über passive Diffusion erfolgen (BICHELE et al., 2000). Es wird auch vermutet, dass das Dehydroascorbat ins Cytosol transportiert und dort reduziert wird (HOREMANS et al., 2000).

Die Ascorbatperoxidase ist ein *scavenger* (Radikalfänger) für Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikale, die auch beim photosynthetischen Elektronentransport (Haber-Weiss-Reaktion) gebildet werden (OHLENSCHLÄGER, 1995). Die Funktion der Ascorbatperoxidase ist unentbehrlich zum Schutz der Chloroplasten und anderen Zellbestandteilen (ASADA, 1992). Ascorbatperoxidase ist ein Häm-haltiges Enzym mit zwei Isoformen, wobei die eine in den Chloroplasten und die andere im Cytoplasma lokalisiert ist. Speziell das chloroplastische Isoenzym, und hier insbesondere das thylakoidgebundene, ist sehr labil, wenn Ascorbat fehlt. Somit ist die Regeneration des Ascorbats nicht nur wichtig für die Reduktion des Hydrogenperoxides, sondern auch zum Schutz der As-

corbatperoxidase, die in Abwesenheit von Ascorbat inaktiviert werden kann (ASADA, 1992; NAKANO & ASADA, 1987).

Analysen haben gezeigt, dass sich die Ascorbatperoxidase wesentlich von den Guajacolperoxidasen (den sogenannten "unspezifischen" Peroxidasen) unterscheidet. Diese Pflanzen-spezifischen Peroxidasen benutzen Ascorbat als Reduktionsmittel und sind für die Detoxifikation des H_2O_2 in den Chloroplasten und im Cytosol verantwortlich (ASADA, 1992). Die Funktion dieser "unspezifischen" Peroxidasen (kurz POX) ist nicht sehr klar definiert, weil diese die Oxidation einer ganzen Reihe von phenolischen Substraten, einschließlich des Guajakols, katalysieren (SIEGEL, 1993). Verschiedene Isoenzyme sind in unterschiedlichen Zellkompartimenten wie Vakuole, Cytosol oder in der Zellwand lokalisiert (SIEGEL, 1993). Es wurden zwei Isoperoxidasen im Apoplasten gefunden (OTTER & POLLE, 1997). Die apoplastische POX spielt eine Rolle bei der Verkettung der Zellkompartimente bei der Polymerisation von Lignin (TAKAHAMA et al., 1996) und Suberinmonomere bei der Wundheilung, und ist daher sehr wichtig beim Schutz vor Pathogenen und Luftschadstoffen (CASTILLO & GREPPIN, 1986; PENEL & CASTILLO, 1989). Die POX-Konzentration kann als universeller Stressindikator betrachtet werden (WEIGEL et al., 1989). Sowohl die Ascorbatperoxidase als auch die unspezifischen Peroxidasen wurden im Apoplasten detektiert (VANNACKER et al., 1998a). Es wird vermutet, dass ca. 7-14 % des Ozons durch das apoplastische Ascorbat detoxifiziert wird und dass die weiteren Radikalfänger weniger als das Ascorbat zur Detoxifikation beitragen (KOLLIST et al., 2000).

Pflanzen reagieren sehr unterschiedlich auf Ozon, was wahrscheinlich auf die unterschiedliche Effektivität der Entgiftungssysteme zurückzuführen ist. Durch die Aktivierung von Entgiftungs- und Reparaturmechanismen findet aber eine Zunahme der Respirationsrate statt (MAGUHN et al., 1994). Zudem werden Stoffwechselprozesse aktiviert, die Energie (in Form von ATP und Reduktionsäquivalenten) verbrauchen, die dann der Pflanze für die Biomasseproduktion fehlt. Durch die Reduktion der Photosyntheserate und die beschleunigte Seneszenz (GRANDJEAN & FUHRER, 1989; OJANPERÄ et al., 1992; FANGMEIER et al., 1993; NIE et al., 1993) wird die Vegetation in ihren Wachstums- und Ertragsparametern beeinflusst.

Als Folge aller dieser Einwirkungen des Ozons auf die Pflanzen sind niedrigere Biomasseproduktionen (ADAROS et al., 1991a; FANGMEIER et al., 1993; BENDER & WEIGEL, 1995; FARAGE & LONG, 1995; KOBAYASHI et al., 1995; HEAGLE & STEFANSKI, 2000) und Ertragsminderungen (GUDERIAN et al., 1985; KRUPA & MANNING, 1988; FUHRER et al., 1989; ADAROS, WEIGEL & JÄGER, 1991b; POLLE et al., 1995; LYONS et al., 1999; OLLERENSHAW et al., 1999; JIN et al., 2001, MAUZERALL & WANG, 2001) festzustellen, was auch von großer wirtschaftlicher Bedeutung ist. Dieses hat dazu geführt, dass vor allem in den Industrieländer Grenzwerte für Ozon gefordert werden.

1.4 Konzepte zur Ableitung von Richtwerten zum Schutz der Vegetation

Alle derzeitigen europäischen und nordamerikanischen Grenz- bzw. Richtkonzentrationen zum Schutz der Vegetation beruhen fast ausschließlich auf Ozonexperimenten in *open-top*-Kammern. Bei solchen Systemen steigt die Schadwirkung mit der Ozonkonzentration an. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Beobachtungen im Freiland. Hier rufen hohe Ozon-Konzentrationen oft geringere Wirkungen hervor als mittlere. Ozonkonzentrationen zwischen 50 und 90 ppb können ein größeres phytotoxisches Potential aufweisen als Konzentrationen über 90 ppb, da bei diesen die Ozonaufnahme limitiert sein kann (GRÜNHAGE & JÄGER, 1994; KRUPA et al., 1994): Konzentrationen von über 90 ppb fallen in Mitteleuropa mit geringerer horizontaler Windgeschwindigkeit und damit relativ hohen Transportwiderständen sowie hohen Temperaturen und damit hohen Wasserdampfsättigungsdefiziten in der Atmosphäre zusammen, was infolge des angespannten Wasserhaushaltes die Schliessung der Stomata hervorruft (GRÜNHAGE et al., 1997). Mit anderen Worten, die aufgenommene Ozondosis wird neben der Ozonkonzentration wesentlich bestimmt durch die Schichtung und die Transporteigenschaften der Atmosphäre sowie den Senkeigenschaften der Vegetation (GRÜNHAGE & HAENEL, 1997).

In einem mechanistischen toxikologischen Modell können nur Stoffflüsse die eigentlichen Wirkungsgrößen sein. Die Wirkung von Ozon im Stoffwechsel ist eine Funktion der im Zeitintervall t_1 bis t_2 absorbierten Dosis, die von FOWLER & CAPE (1982) als *pollutant absorbed dose*, kurz *PAD*, bezeichnet wurde:

$$\text{Wirkung} = f(\text{PAD}(\text{O}_3)) = f \left[\int_{t_1}^{t_2} |F_{\text{absorbiert}}(\text{O}_3)| \cdot dt \right] \quad (5)$$

mit $F_{\text{absorbiert}}(\text{O}_3)$, der stomatären Ozonaufnahme in der Einheit $\text{mg m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Die zunehmende Gefährdung der Vegetation durch Ozon verlangt Maßnahmen, die die Immissionen in der Zukunft vermindern. Das allerdings setzt das Vorhandensein von Grenz- oder Richtwerten voraus, welche realistische Gefährdungspotentiale auf regionaler Ebene widerspiegeln. In Europa erfolgt die Ableitung von Grenzwert-Richtwerten zum Schutz der Vegetation im Rahmen des Luftreinhalteübereinkommens "Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution" der UN-ECE. Hierbei wird unterschieden zwischen *critical levels* (kritische Konzentrationen) und *critical loads* (kritische Depositionen). Diese stellen Schwellenwerte für die Wirkung von Luftverunreinigungen dar.

Laut UNECE (1996) werden *critical levels* als

the atmospheric concentrations of pollutants in the atmosphere above which adverse effects on receptors, such as human beings, plants, ecosystems or materials, may occur according to present knowledge

definiert. Für *critical loads* gilt:

A quantitative estimate of an exposure to one or more pollutants below which significant harmful effects on specified sensitive elements of the environment do not occur according to present knowledge.

Beide Konzepte stellen lediglich Empfehlungen zum Schutz der Vegetation aus naturwissenschaftlicher Sicht dar, sind aber keine rechtsverbindlichen Werte.

Der erste *critical level*, der 1988 in Bad Harzburg (Deutschland) formuliert wurde, war ein 7 Stundenwert (9-16 h) von 25 ppb O₃ über der Vegetationsperiode (UNECE 1988). Auf einer Folgetagung 1992 in Egham (England) wurde empfohlen einen *critical level* auf der Basis eines Konzentrationssummenwertes unter Berücksichtigung eines Schwellenwertes zu erarbeiten (ASHMORE & WILSON, 1992). In Bern 1994 (Schweiz) wurden dann *critical levels* auf der Basis des AOT40 Indices (*accumulated exposure over a threshold of 40 ppb*) formuliert (FUHRER & ACHERMANN, 1994).

$$\text{AOT40} = \sum_{i=1}^n \left[c_{\text{O}_3} - 40 \right]_i \quad \text{mit} \quad c_{\text{O}_3} > 40 \text{ ppb} \quad [\text{ppb.h}] \quad (6)$$

wobei, c_{O_3} Ozonkonzentration in ppb (Stundenwert)

i Laufindex

n Anzahl der Stundenwerte mit $c_{\text{O}_3} > 40$ ppb im Beurteilungszeitraum

Es handelt sich um einen Konzentrationssummenwert oberhalb eines definierten Schwellenwertes - berechnet wird die Summe der Differenzen zwischen den stündlichen O₃-Konzentrationen und dem Schwellenwert von 40 ppb für alle Tageslichtstunden, in denen die O₃-Konzentration den Schwellenwert übersteigt.

Es wurden vorläufige *critical levels* für Kulturpflanzen und für Bäume empfohlen, die mit bestimmten Ertragsverlusten einhergehen. Für die Vermeidung sichtbarer Schäden wurde ein zusätzlicher *critical level* empfohlen. Die AOT40-Werte setzen neben der optimalen Wasserversorgung voraus, dass die Ozonkonzentration an der Oberfläche des Bestandes an der oberen Grenzfläche - der quasi-laminaren Schicht - bestimmt werden.

1996 in Kuopio (Finnland) wurde dieses Konzept abschliessend diskutiert und verabschiedet (KÄRELAMPI & SKÄRBY, 1996). Zur Vermeidung von Ertragsverlusten bei Kulturpflanzen sollte ein AOT40-Wert von 3000 ppb.h (akkumuliert über drei Monate)

und entsprechend für Bäume 10000 ppb.h (akkumuliert über sechs Monate) nicht überschritten werden. Dabei wurde jene Ozonbelastung definiert, bei der mit einem 5 %igen (bei Nutzpflanzen) oder 10 %igen (bei Bäumen) Ernteverlust zu rechnen ist. Für die halb-natürliche Vegetation wurde der gleiche AOT40 wie für Kulturpflanzen angesetzt (3000 ppb.h; Dreimonatssumme). Der Ansatz zur Vermeidung sichtbarer Schädigung wurde durch die Einbeziehung des Einflusses des *vapour pressure defizit* (VPD) modifiziert. Diese *critical levels* bilden die Grundlage für die aktuelle Europäische Richtlinie (Richtlinie 2002/2/EG).

Ergänzend wurde 1999 in Gerzensee (Schweiz) zwischen einjährigen und mehrjährigen Pflanzen der halb-natürlichen Vegetation unterschieden (FUHRER & ACHERMANN, 1999), was allerdings schon 2002 in Göteborg widerrufen wurde. Der AOT40 wurde für die annualen Pflanzen auf 3000 ppb.h (Dreimonatsperiode) und für die perennierenden Pflanzen (Sechsmonatsperiode) auf 7000 ppb.h formuliert. Zusätzlich orientierte man sich langsam mehr an dem sogenannten *critical level II approach*. In diesem Konzept werden *critical levels* über Wichtungsfaktoren weiter modifiziert, so dass der Einfluss des Bodenwasserhaushaltes, des Wasserdampfsättigungsdefizits der Atmosphäre oder des Entwicklungsstadiums des Rezeptors auf die Schadgasaufnahme berücksichtigt werden kann. Die Notwendigkeit von flussbezogenen Grenzwerten wurde ersichtlich, was schon während des Workshops 1994 in Bern von GRÜNHAGE und JÄGER betont wurde (GRÜNHAGE & JÄGER, 1994). 2002 in Göteborg (Schweden) wurden schließlich erste *critical levels* basierend auf stomatären Aufnahmen für Weizen und Kartoffel diskutiert (KARLSSON et al., 2003), die 2004 in das aktuelle *Manual on methodologies and criteria for Modelling and Mapping critical loads & levels* Eingang gefunden haben (UNECE, 2004). Die Definition des *critical levels* wurde wie folgt modifiziert:

Concentration, cumulative exposure or cumulative stomatal flux of atmospheric pollutants above which direct adverse effects on sensitive vegetation may occur according to present knowledge.

Kritisch anzumerken ist, dass diese flussbezogenen Werte auf Experimente mit *open-top*-Kammern beruhen. Aufgrund der auftretenden Kammereffekte (wie erhöhte Temperatur (GRÜNHAGE et al., 1990; WALLIN et al., 2002), veränderten Lichtintensitäten (FUHRER et al., 1992), Windgeschwindigkeiten (CLARK et al., 2000), konstanter O₃-Transport zur Pflanzenoberfläche) bedarf es vorrangig einer Ableitung von Fluss-Wirkung-Beziehungen im Freiland, zumindest aber eine Validierung der existierenden Fluss-Wirkung-Beziehung unter Freilandbedingungen (GRÜNHAGE & JÄGER 2003; GRÜNHAGE et al., 2004).

1.5 Zielsetzung

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, Fluss-Wirkung-Beziehungen für Biomasseproduktion und das Auftreten erster sichtbarer Schadsymptome unter Freilandbedingungen bei *Trifolium repens* zu erarbeiten. Dazu wurde das PLATIN-Modell (**PL**ant-**AT**mosphere **IN**teraction), welches zur Bestimmung des Gasaustausches zwischen Vegetation und bodennaher Atmosphäre entwickelt wurde (GRÜNHAGE & HAENEL, 1997), benutzt.

Die vorliegende Arbeit war Teil der UN/ECE-Forschungskooperative "International Cooperative Programme on Effects of Air Pollution and Other Stresses on Crops and Non-Wood Plants (ICP-VEGETATION)". In diesem Kooperationsprojekt sollte ein in den Vereinigten Staaten entwickeltes Weissklee-Indikatorsystem für bodennahes Ozon erprobt werden. Dieses beruht auf der unterschiedlichen Reaktion des Pflanzenwachstums und der Schadausprägung zweier unterschiedlich sensibler Genotypen von *Trifolium repens* cv. Regal (NC-Sensitive, NC-Resistant; HEAGLE et al., 1994, 1995, 1996) auf die aufgenommene Ozondosis.

Für die Ableitung von Fluss-Wirkung-Beziehungen unter Freilandbedingungen wurde Klee gewählt, weil *Trifolium repens* einer der ozonempfindlichsten Arten Mitteleuropas ist. Damit wird der Überlegung gefolgt, dass wenn eine der empfindlichsten Arten vor Schädigung geschützt wird, der weitgehende Schutz der Vegetation gewährleistet ist.

Als Beitrag zum Kooperationsprojekt musste zunächst geprüft werden, ob das in Amerika entwickelte Klee-Indikatorsystem in Mitteleuropa zur Ableitung einer Dosis-Ertrag-Beziehung über das "NC-S/NC-R"-Verhältnis etabliert werden kann. Die Ableitung einer Beziehung für das Auftreten sichtbarer Schadsymptome sollte für den O₃-empfindlichen Klon NC-S erfolgen. Neben der stomatären Aufnahme als Dosismaß sollte auch der in den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts etablierte AOT40-Expositionsindex (*Accumulated exposure Over a Threshold of 40 ppb*) vergleichend hinzugezogen werden.

Desweiteren sollte in open-top-Kammerexperimenten untersucht werden, worin die unterschiedliche Sensitivität der beiden Kleeklone besteht. Diese können (i) auf verschiedenen stomatären Widerständen, (ii) auf Unterschiede in der Blattanatomie (interne Widerstände u.a. unterschiedliche Mesophyllwiderstände) und (iii) auf den Entgiftungsmechanismen beruhen.

2. MATERIAL UND METHODEN

Zur Erarbeitung der Dosis-Wirkung-Beziehungen wurden zwei amerikanische Genotypen von *Trifolium repens* cv. Regal (HEAGLE et al., 1994, 1995, 1996), einer resistent (R) und einer sensitiv (S), in vier aufeinanderfolgenden Jahren jeweils von Mai bis Oktober im Freiland auf dem Gelände der Umweltbeobachtungs- und Klimafolgenforschungsstation in Linden-Leihgestern exponiert. Als Wirkungskriterien wurden Wachstums- und Ertragsparameter erfasst. Weiterhin wurden Antioxidantien im Apoplasten und im gesamten Blatt bestimmt, sowie EDAX- und Rasterelektronenmikroskopische Analysen durchgeführt.

2.1 Kultur und Exposition der Versuchspflanzen

Virusfreie Kleestecklinge (ca. 7-10 cm Länge) wurden im Gewächshaus für 28 Tagen standardisiert in einer Einheitserde (ED 73) angezogen. Die Stecklinge wurden laut dem ICP-PROTOKOLL (UNECE, 1996; 1997; 1998; 1999) 10 Tage nach der Anzucht mit *Rhizobium* inokuliert, nach 21 Tagen mit Peters-Düngung (8-12-24) gedüngt und anschließend nach 28 Tagen in 16,4 l Gefäße (Riviera) umgepflanzt und ins Freiland ausgesetzt. Die speziellen Gefäße verfügen über ein Wasserreservoir von 4,5 l, so dass der Wurzelraum immer Feldkapazität erreicht. Mit Hilfe dieses Reservoirs ist es möglich den Wasserverbrauch regelmäßig über den Expositionszeitraum zu bestimmen. Die eingesetzte Erde war ein Gemisch aus Einheitserde (ED 73), Sand und Vermiculit (1:1:1). Die Einheitserde besteht aus Ton und Hochmoortorf und verfügt über alle für das Pflanzenwachstum erforderlichen Nährstoffe in Form eines Langzeitdüngers. Der Ton ist reich an Spurenelementen und besitzt ein hohes Sorptions- und Pufferungsvermögen. Der Torf lockert das Substrat und fördert die Wurzelbildung der Pflanzen. Die Zusammensetzung der Nährstoffe war wie folgt:

N : 250-450 mg/l P₂O₅: 200-300 mg/l K₂O : 250-450 mg/l

Zusätzlich zu dem im Substrat enthaltenen Langzeitdünger wurden die Pflanzen einmal mit 93,75 mg N (Peters 8-12-24, Compo) pro Gefäß gedüngt. Zudem wurde in 5 Schichten ein Langzeitdünger (Osmocote; 14:14:14 N:P:K, Scotts Deutschland GmbH) beigemischt, um eine ausreichende Ernährung zu gewährleisten.

Der Befall der Pflanzen mit Spinnmilben oder weißer Fliege erforderte die Anwendung von verschiedenen Nützlingen wie der *Phytoseiulus* Raubmilbe gegen Spinnmilben und der *Encarsia* Schlupfwespe gegen weiße Fliegen (beide von Neudorff). Eine Behand-

lung mit Pflanzenschutzmitteln wurde gegen Läuse (Neudosan; Neudorff) und Mehltau (Corbel, Ciba; Titane Ultra, CF Spieß & Sohn GmbH) bei Bedarf vorgenommen.



Abb. 4: Anordnung der Kleegefäße in der Höhe einer halb natürlichen Vegetation im Freiland



Abb. 5: *open-top*-Kammeranlage auf dem Gelände der Umweltbeobachtungs und Klimafolgenforschungsstation Linden-Leihgestern

Zur Erarbeitung einer Fluss-Wirkung-Beziehung sichtbarer Schadsymptome wurden die Kleegefäße über die ganze Vegetationsperiode (Mitte Mai bis Mitte September) in der Höhe einer halb-natürlichen Vegetation auf dem Gelände der Umweltbeobachtungs- und Klimafolgenforschungsstation in Linden-Leihgestern exponiert (Abb. 4).

Zur Untersuchung der physiologischen Fragestellungen wurden 4 open-top-Kammern eingesetzt (Abb. 5). Der prinzipielle Kammeraufbau ist bei FANGMEIER et al. (1992) detailliert beschrieben. Die Folie der in der vorliegenden Untersuchung benutzten Kammern reichte nur bis zur Mitte der Kammer (Abb. 5, 6).

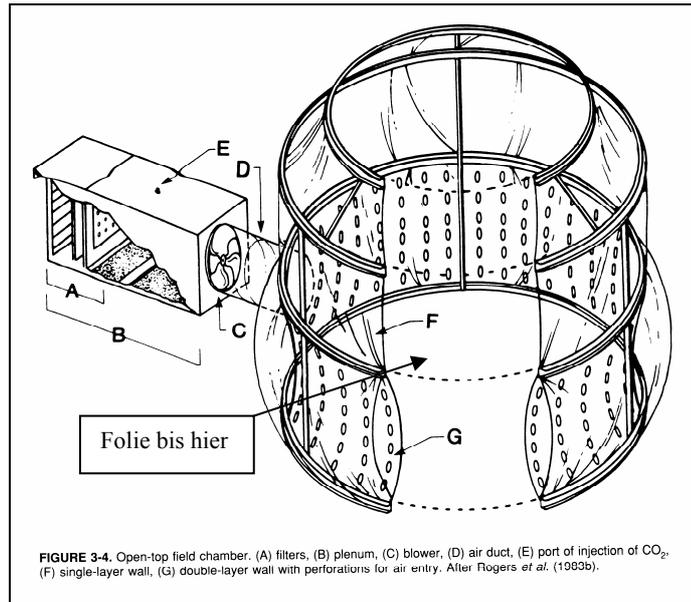


Abb. 6: Schematisierte Darstellung einer *open-top*-Kammer (nach ROGERS et al., 1983)
 (A) Aktivkohlefilter; (B) Filter- und Gebläsesystem; (C) Gebläse; (D) Luftstutzen; (E) Injektionsstelle für Spurengase; (F) Folie (G) Folienschlauch mit Perforationen auf der Innenseite zur Freisetzung des Luftgemisches

Von den vier Kammern wurden zwei mit Außenluft versorgt und zwei mit Außenluft + Ozon. Die Ozonbelastung wurde mit Hilfe eines Ozongenerators (Fischer Ozongenerator 500 Gas selector SEL-4 DMP AG) 12 h pro Tag (von 8:00 bis 20:00) um 20 ppb erhöht. Für die Messung der Ozonkonzentration wurde alle 7 Minuten eine andere Kammer beprobt (Ozonanalysator MLU Modell 400, SM-MUX4 IMKO GmbH) und anschließend der Mittelwert der letzten 3,5 Minuten dieser Kammer berechnet. Die 24h-Mittelwerte über die Expositionszeiträume für die Jahre 1998-1999 sind in der Abbildung 8 dargestellt.



Abb.7 : Anordnung der Gefäße in der *open-top*-Kammer

In jede Kammer wurden acht Gefäße pro Klee-klon abwechselnd gestellt. Neben den in 2.3.1 und 2.3.2 wiedergegebenen Parametern wurden die in 2.3.6 genannten Messungen vorgenommen. Die 24h-Mittelwerte der Ozonkonzentrationen und die entsprechenden AOT40 Werte über die Expositionszeiträume sind in der Tabelle 1 dargestellt. Die Gefäße wurden in der nördlichen Hälfte der Kammer angeordnet, um optimale Strahlungsverhältnisse zu gewährleisten (Abb. 7). Die Temperatur in Pflanzhöhe wies im Vergleich zum Freiland minimal höhere Werte auf (ca. 1-2 °C).

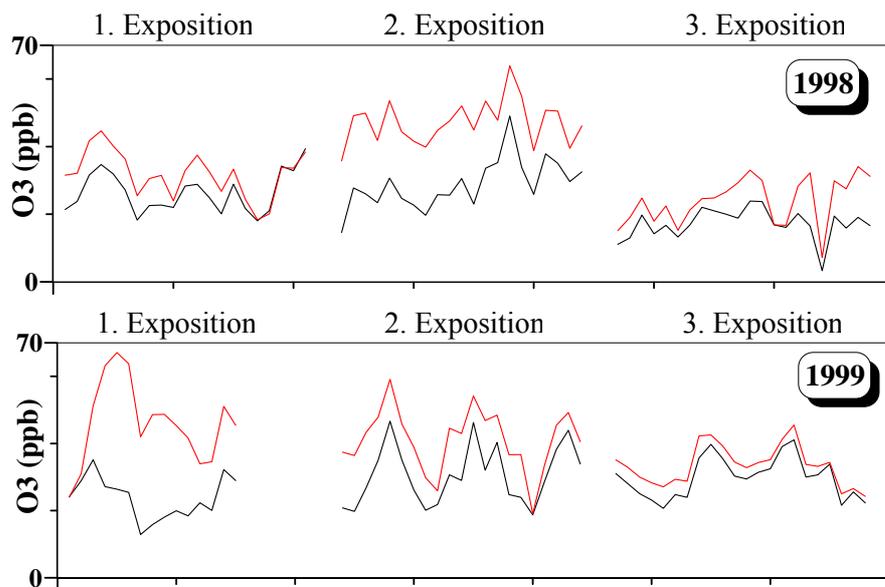


Abb. 8: Tagesmittelwerte der Ozonkonzentrationen über die Expositionszeiträume für die Jahre 1998 und 1999. (Schwarze Linie: Außenluft-O₃-Konzentration; Rote Linie: Außenluft-O₃-Konzentration + 20 ppb O₃)

Tabelle 1: 24h-Mittelwerte der Ozonkonzentrationen und die entsprechenden AOT40 Werte für die Zeiträume in denen das Pflanzenmaterial für die physiologischen Untersuchungen exponiert war (siehe 3.5.1)

Jahr	Infiltrations- ansatz	Kontroll-Kammer (NF)		O ₃ -Kammer	
		24h x O ₃ (ppb)	AOT-40 (ppb*h)	24h x O ₃ (ppb)	AOT-40 (ppb*h)
1998	1	27	650	32	1063
	2	30	2548	46	5214
	3	17	0	24	453
1999	1	24	750	46	3630
	2	34	2424	35	2540
	3	30	1972	33	2184

2.2 Berechnung des Ozonaustausches zwischen dem Modell-System "Klee" und der bodennahen Atmosphäre

Der Austausch von O₃ zwischen Phytosphäre und der bodennahen Atmosphäre, $F_{\text{total}}(\text{O}_3)$ [$\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$], kann wie in GRÜNHAGE & HÄENEL (1997) und GRÜNHAGE et al. (2000) detailliert dargestellt, mit Hilfe der Formel

$$F_{\text{total}}(\text{O}_3) = \frac{c_{\text{O}_3}(z_{\text{ref},\text{O}_3})}{R_{\text{ah}} + R_{\text{b},\text{O}_3} + R_{\text{c},\text{O}_3}} \quad (7)$$

beschrieben werden, wobei $c_{\text{O}_3}(z_{\text{ref}})$ die O₃ Konzentration gemessen in einer Referenzhöhe z_{ref} [$\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$], R_{ah} der turbulente atmosphärische Widerstand [$\text{s}\cdot\text{m}^{-1}$] der den Lufttransport zwischen der Referenzhöhe $z_{\text{ref},\text{O}_3}$ oberhalb der Vegetation und der Höhe $z = d + z_{0\text{m}}$, die die Senke für dem Impuls repräsentiert (d = Verschiebungshöhe, $z_{0\text{m}}$ = Rauigkeitslänge für den Impuls), R_{b,O_3} der Widerstand der quasi-laminaren Schicht [$\text{s}\cdot\text{m}^{-1}$] zwischen Impulssenke $z = d + z_{0\text{m}}$ und der O₃ Senke $z = d + z_{0,\text{O}_3}$ und R_{c,O_3} der Bestandeswiderstand [$\text{s}\cdot\text{m}^{-1}$], der die Einflüsse des Pflanze/Boden Systems auf den vertikalen Austausch des O₃ beschreibt, sind.

Der Bestandeswiderstand R_{c,O_3} wird mit Hilfe verschiedener in Serie oder parallel geschalteter Einzelwiderstände approximiert (GRÜNHAGE et al., 2000):

$$\frac{1}{R_{\text{c},\text{O}_3}} = \left[(1 - \beta^*) \cdot \left(\frac{1}{R_{\text{c},\text{stom},\text{O}_3} + R_{\text{c},\text{mes},\text{O}_3}} + \frac{1}{R_{\text{c},\text{cut},\text{O}_3}} \right) + \frac{1 - \beta}{R_{\text{c},\text{ext},\text{O}_3}} + \frac{\beta}{R_{\text{Boden},\text{O}_3}} \right] \quad (8)$$

mit R_{c, stom, O_3} der stomatäre Widerstand des Bestandes, R_{c, mes, O_3} ($= 0,01 \text{ s}\cdot\text{m}^{-1}$) der Mesophyllwiderstand des Bestandes, R_{c, cut, O_3} ($= 10,9\cdot 10^6 \text{ s}\cdot\text{m}^{-1}$) der cuticuläre Widerstand des Bestandes, R_{c, ext, O_3} ($= 725 \text{ s}\cdot\text{m}^{-1}$) der Widerstand der externen Pflanzenoberflächen für einen vollentwickelten Bestand und R_{Boden, O_3} ($= 375 \text{ s}\cdot\text{m}^{-1}$) der Bodenwiderstand. β^* und β sind gewichtete Funktionen, die vom aktuellen Entwicklungsstadium der Pflanze abhängig sind (GRÜNHAGE & HÄENEL, 1997; GRÜNHAGE et al., 2000).

Wie bereits einleitend erwähnt, ist die stomatäre Ozonaufnahme $F_{\text{absorbiert}}(O_3)$ nur ein Teil des gesamt ausgetauschten Ozons:

$$F_{\text{total}}(O_3) = F_{\text{absorbiert}}(O_3) + F_{\text{externePflanzenoberflächen}}(O_3) + F_{\text{boden}}(O_3) \quad (9)$$

Die Berechnung der stomatären Aufnahme geschieht unter Berücksichtigung aller Widerstände (Gleichung 10).

$$F_{\text{absorbiert}}(O_3) = - \frac{c_{O_3}(z_{\text{ref}})}{R_{\text{ah}} + R_{\text{b}, O_3} + \frac{R_{c, \text{absorbiert}, O_3}}{1 - \beta^*} + \left([R_{\text{ah}} + R_{\text{b}, O_3}] \cdot \frac{R_{c, \text{absorbiert}, O_3}}{1 - \beta^*} \cdot \left[\frac{1 - \beta}{R_{c, \text{ext}, O_3}} + \frac{\beta}{R_{\text{Boden}, O_3}} \right] \right)}$$

mit $\frac{1}{R_{c, \text{absorbiert}, O_3}} = \frac{1}{R_{c, \text{stom}, O_3} + R_{c, \text{mes}, O_3}} + \frac{1}{R_{c, \text{cut}, O_3}} \cong \frac{1}{R_{c, \text{stom}, O_3} + R_{c, \text{mes}, O_3}}$ (10)

Die Modellierung des Ozonaustausches zwischen Vegetation und bodennaher Atmosphäre wurde mit Hilfe des *big-leaf* Modells PLATIN (Plant-ATmosphere Interaction; GRÜNHAGE & HAENEL, 1997) unter Berücksichtigung der Energiebilanz durchgeführt. Neben der Ozonkonzentration in einer Referenzhöhe (3,5 m) werden folgende meteorologische Größen benötigt:

- Windgeschwindigkeit (m/s) (in 8,5 m oder 10 m Höhe)
- Globalstrahlung (W/m^2)
- Lufttemperatur ($^{\circ}\text{C}$)
- Luftfeuchtigkeit (%)
- Niederschlag (mm)
- Luftdruck (hPa)

Diese Parameter wurden von der Umweltbeobachtungs- und Klimafolgenforschungsstation in Linden-Leihgestern kontinuierlich als halbstunden Mittelwerte erfasst und in einer Datenbank abgelegt. Die Bestandesarchitektur und –entwicklung wird über die folgenden Größen charakterisiert:

- Rauigkeitslänge für Impuls, z_{0m} (m)
- Verschiebungshöhe d (m)
- Blattflächenindex nicht-seneszenter Blätter $LAI_{grün}$ (m^2/m^2)
- Blattflächenindex des Gesamtbestandes LAI_{total} (m^2/m^2)
- kuzwellige Albedo α

Das Widerstandsmodell PLATIN beschreibt den Stoff- und Energieaustausch auf Bestandesebene. Die zugrunde liegende mikrometeorologische Theorie setzt Feldgrößen von mehreren Hektar voraus, sodass diese Modelle nicht ohne weiteres kleinräumig (Gefäß-Ebene) angewendet werden können. Da aus methodischen Gründen kein Klee-feld mit geklonten Stecklingen etabliert werden konnte, wurden, wie bereits in Kapitel 2.1 ausgeführt, Kleegefäße mit einem Durchmesser von 31,5 cm in einem Grünlandökosystem exponiert. Aus diesem Grund musste das Gefäß daher in einer Feldumgebung modelliert werden. Da das Gefäß relativ zur Umgebung gesehen klein ist, wird die Strömung / Turbulenz der Umgebung von der Rauigkeit des Gefäßes nicht beeinflusst. Während die Kleegefäße optimal mit Wasser versorgt wurden (Feldkapazität) war der Bodenwassergehalt des umliegenden Grünlandökosystems den natürlichen Schwankungen unterlegen (Niederschlag, Trockenperioden). Die Kleegefäße standen deshalb in der Regel in einer relativ gesehen trockeneren Umgebung, sodass der sogenannte "Oasen-Effekt" im Modell berücksichtigt werden musste. Dieser Effekt beschreibt, dass kleine, feuchte Flächen in einer trockeneren Umgebung mehr verdunsten, als ausgedehnte feuchten Flächen es tun würden, und zwar um so mehr, je kleiner die ("Insel"-) Fläche ist (VAN EIMERN & HÄCKEL, 1984; BRUTSAERT, 1984).

Für die vorliegende Untersuchung stand eine PLATIN-Version zur Verfügung, die sowohl den Energie- und Stoffaustausch auf ökosystemarer Ebene als auch auf Gefäßebene unter Berücksichtigung des Oasen-Effekts modelliert. Um zu überprüfen, ob die Modellannahmen stimmen wurde ein Grünland-Gefäß mit den Eigenschaften des umliegenden Grünland-Ökosystems (identische Größen: Blattflächenindex, Bestandeshöhe, Bodenwasserhaushalt, etc.) simuliert. Wie in Abb. 9 dargestellt entspricht die Evapotranspirationsrate des simulierten Grünland-Gefäßes dem des Grünland-Ökosystems.

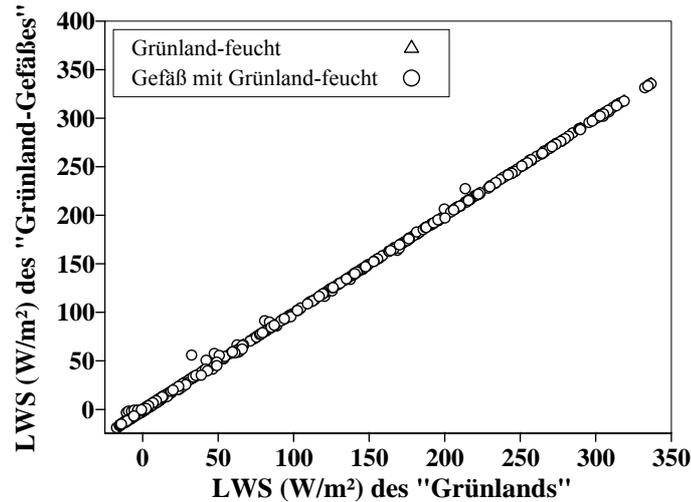


Abb. 9: Vergleich der modellierten Evapotranspirationsraten eines im Grünland exponierten "Grünland-Gefäßes" mit diesem feuchten Grünland (LWS= latenter Wärmestrom in Wm^{-2})

Desweiteren wurde die Evapotranspiration eines Grünland-Ökosystems bei Feldkapazität mit den Evapotranspirationsraten eines Grünland-Ökosystems unter trockenen Bedingungen ($0,2 \text{ m}^3 / \text{m}^3$) verglichen. Erwartungsgemäss liegen die Evapotranspirationsraten des "feuchten Grünlandes" über denen des "trockenen Grünlandes" (Abb. 10).

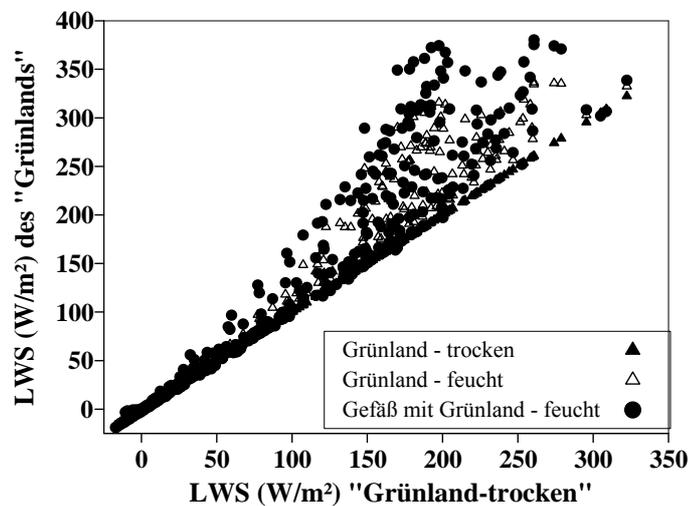


Abb. 10: Vergleich der modellierten Evapotranspiration des feuchten Grünland-Gefäßes (modelliert in einer trockene Grünland-Umgebung) mit feuchtem und trockenem Grünland (LWS= latenter Wärmestrom in Wm^{-2})

Vergleicht man die Evapotranspirationrate eines "feuchten Grünland-Gefäßes" in einer trockenen Umgebung unter der Berücksichtigung des Oasen-Effektes mit denen des "feuchten Grünland-Ökosystems" so wird der Einfluss des Oasen-Effektes auf die Eva-

potranspirationsraten deutlich: Die Evapotranspirationsraten des "feuchten Grünland-Gefäßes" liegen deutlich über denen des "feuchten Grünland-Ökosystems" (Abb. 10). Diese Differenz spiegelt den Oaseneffekt wider.

Das Modell wurde an die Daten von 1997 und 1998 angepaßt, die Jarvis-Faktoren wurden ermittelt und mit den Daten von 1999 verifiziert. Für das Jahr 1996 wurde, wegen des fehlenden Blattflächenindex (LAI) und Höhen-Messung, nur die PAD errechnet.

Bei der Berechnung der Evapotranspiration wurde bis zu einem LAI von 6 modelliert. Der gleiche LAI würde bei der Berechnung der PAD ein Problem auftauchen lassen: Je größer LAI wird, desto größer wird auch die photosynthetisch aktive Fläche des Bewuchses, d.h. desto größer wird der Gasaustausch und damit auch PAD. Bei unterschiedlichen LAIs kann man also schlecht die PADs untereinander vergleichen, denn die exponierte Fläche ist unterschiedlich. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Norm-PAD berechnet (Gleichung 11). Mit der Verwendung dieser normierten PAD kann man die verschiedenen Termine unabhängig von den jeweiligen LAI miteinander vergleichen.

$$\text{Norm-PAD} = \frac{\text{PAD}_A}{\text{LAI}_{EF}} \quad (11)$$

wobei PAD_A die PAD nach (GRÜNHAGE et al., 1999) und LAI_{EF} das effektive LAI, das bei jedem gemessenen LAI berechnet wird, ist.

Für die Ableitung der *Pollutant Absorbed Dose (PAD)* muss die gleiche Vorgehensweise angewendet werden, wie bei der Evapotranspiration. Es muss also zunächst überprüft werden, ob die Modellannahmen stimmen. Dafür wird auch hier, wie bei der Evapotranspiration, ein Kleegefäß wie ein Grünlandbestand modelliert. Mittels der Graphik 11a wird deutlich, dass das Gefäß mit den gleichen Umgebungsbedingungen die gleiche PAD aufweist wie das Feld. Bei der Abbildung 11b sieht man, dass das feuchte Gefäß in einer trockenen Umgebung eine höhere Dosis absorbiert, als die trockenere Umgebung. Es spielt also auch hier der "Oasen-Effekt" eine große Rolle. Wie schon gezeigt wurde, ist unter Einfluss des Oasen-Effekts die Evapotranspiration beziehungsweise der Gasaustausch größer und demzufolge ist auch die PAD größer. In Abbildung 11c wird der Effekt der PAD-Normierung auf 1 effektive LAI-Einheit deutlich: die Norm-PAD eines Bestandes mit $\text{LAI} = 2\text{m}^2/\text{m}^2$ unterscheidet sich nur unwesentlich von der Norm-PAD eines Bestandes mit $\text{LAI} = 4\text{m}^2/\text{m}^2$.

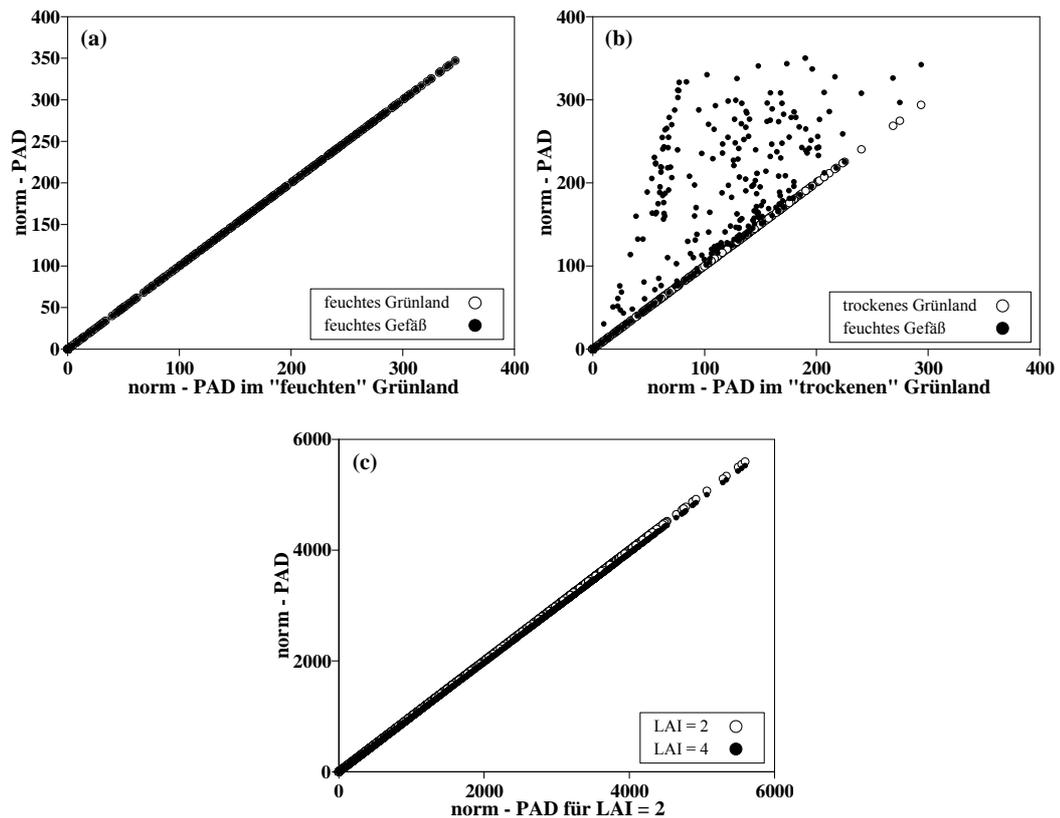


Abb. 11: (a) Vergleich der modellierten Norm-PAD einer feuchten Umgebung mit einem feuchten Gefäß. (b) Vergleich der Norm-PAD einer trockenen Umgebung mit einem feuchten Gefäß (modelliert in einer trockenen Umgebung). (c) Vergleich der Norm-PAD eines Bestandes mit LAI = 2 und eines mit LAI = 4

2.3 Wirkungserhebungen

2.3.1 Symptomatologie

Während der Vegetationsperiode wurden wöchentlich – manchmal auch zwei mal in der Woche - Bonituren durchgeführt. Folgende Parameter wurden bei den Bonitierungen erfasst:

- Anzahl der gesamten grünen Blätter
- Anzahl der gesamten seneszenten Blätter
- Anzahl der Blüten
- Prozentuale Schädigung der Blätter (%)
- Wuchshöhe (cm)

Als "senescente" Blätter wurden Blätter charakterisiert, deren Schädigung durch Nekrosen oder Chlorosen über 50 % lag. Die Wuchshöhe wurde als die Länge des Stengels vom Substrat bis zum Blätterdach definiert. An den Boniturtagen wurden, sowohl beim bewachsenen als auch beim unbewachsenen Boden, Messungen der Albedo vorgenommen. Dafür wurde das Gerät LI-185b (LI-COR, Nebraska, USA) benutzt.

2.3.2 Ertrag

Die zwei Klone (10 Gefäße pro Kleeclon) wurden nach 28 Tagen jeweils in 7 cm Höhe geerntet. Es gab fünf (1996) beziehungsweise vier (1997-1999) Erntetermine. Aus der folgenden Tabelle sind die verschiedenen Erntetermine zu entnehmen.

Tabelle 2: Erntetermine in den verschiedenen Expositionsjahren

Erntetermine	1996	1997	1998	1999
1	20.6.	23.6.	15.6.	07.6.
2	18.7.	21.7.	13.7.	05.7.
3	15.8.	18.8.	10.8.	02.8.
4	12.9.	15.9.	07.9.	30.8.
5	10.10.	-	-	-

Die oberirdische Biomasse wurde in verschiedene Fraktionen unterteilt. Folgende Wachstumsparameter (g/Gefäß) wurden untersucht:

- Frisch- und Trockengewicht grüner Blätter
- Trockengewicht seneszenter Blätter
- Frisch- und Trockengewicht der Stiele
- Frisch- und Trockengewicht der Stolone
- Frisch- und Trockengewicht der Blüten

Unmittelbar nach der Ernte wurde das Frischgewicht mit einer Waage (SM 1000, Sauter) festgestellt. Um das Trockengewicht zu bestimmen, wurde das geerntete Pflanzenmaterial für drei Tage bei 80 °C (bis zur Gewichtskonstanz) getrocknet und anschließend gewogen. Aus den Ergebnissen wurde das S/R Verhältnis (sensitiv / resistent) der produzierten Biomasse der beiden Klone errechnet und diente zur Abschätzung des Einflusses von O₃ auf die Biomasseproduktion.

2.3.3 Leaf-Area-Index (LAI)

Der Leaf Area Index (LAI) zeigt, wie sich die Blattfläche über die verschiedenen Expositionszeiträume entwickelt hat. Er wird als Blattfläche pro Bodenfläche definiert. Für die Bestimmung des LAI wurde eine gesonderte Reihe von Pflanzen benutzt. Alle vier Tage wurden von jedem LAI-Gefäß zwei Proben von je 5 g entnommen. Von dieser Teilprobe wurden die Blattfläche bestimmt (LI-3050A/4, LI-COR, USA) und die mittlere Blattfläche pro Blatt ermittelt. Aus diesen Daten wurde eine Regressionsgerade (Tag 0 bis Tag 28) berechnet, mit deren Hilfe die LAI-Entwicklung der Pflanzen des Modellansatzes für jeden Expositionszeitraum ermittelt werden konnte.

2.3.4 Wasserverbrauch

Um mögliche Unterschiede im H₂O-Verbrauch der beiden Klone festzustellen, wurde alle 2 bis 3 Tage die noch verfügbare H₂O-Menge bestimmt. Zur Messung der Evaporation unter Freilandbedingungen wurden unbewachsene Gefäße (reines Kultursubstrat) verwendet. Die volumetrische Bodenfeuchtigkeit wurde mit TDR-Sonden (*time domain reflectrometry*, Typ P2G, Imko, Deutschland) regelmäßig gemessen, um sicher zu stellen, dass die Feldkapazitätsfeuchte gewährleistet war.

2.3.5 Gaswechsel

Gaswechsellmessungen auf Blattebene wurden direkt im Freiland vorgenommen; die Messungen erfolgten sowohl an bewölkten als auch an sonnigen Tagen. In den Jahren 1997-1998 wurde mit einem geschlossenen tragbaren Gaswechsellmeßsystem, LI-6200 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) gearbeitet. Eine Funktionsbeschreibung des Systems findet sich bei FIELD et al. (1989), VON WILLERT et al. (1995) und GRÜTERS (1998).

Es wurde eine Viertel-Liter-Kammer eingesetzt und die Gasflüsse auf die Photosynthese des eingespannten Blattes abgestimmt, d.h. die genaue Kenntnis der eingespannten Blattfläche war die Voraussetzung um exakte Ergebnisse zu erzielen. Da das dreifriedrige Kleeblatt zu groß für die Messkammer war, wurde nur eines der drei Fiederblättchen eingespannt. Für die Ermittlung der Blattfläche wurden eine Reihe von Blättern abgeschnitten, kopiert und vergrößert, um den Fehler zu minimieren. Die Flächen der kopierten, ausgeschnittenen Blätter wurden mittels des Blattflächenmessgerätes (LI-3050A/4, LI-COR, USA) bestimmt. Anschließend wurde die Fläche in Beziehung zur

Länge * Breite des entsprechenden Blattes gesetzt. Mittels einer linearen Regression wurde die gesuchte Beziehung ermittelt, welche für jeden Klon unterschiedlich war.

$$\text{Für den S-Klon: } y = 0,735018 * x - 0,0743376 \quad (12)$$

$$\text{Für den R-Klon: } y = 0,727469 * x + 0,00669395 \quad (13)$$

wobei: $y = \text{Fläche}$

$x = \text{Länge} * \text{Breite}$

2.3.6 Stoffwechsparemeter

Während der Expositionsjahre 1997 - 1999 wurden jede Woche 2 Pflanzen pro Klon aus den open-top Kammern geerntet. Ein Teil wurde unmittelbar für den Infiltrationsversuch (siehe 2.3.7) verwendet ein weiterer Teil für die spätere Aufarbeitung zur Bestimmung von Ascorbinsäure, Ascorbatperoxidase und der unspezifischen Peroxidasen bei -80 °C aufbewahrt.

Bestimmung des Ascorbinsäuregehaltes

Die Messungen wurden nach einer von OKAMURA (1980) ausgearbeiteten und von BRÄUNING (2002) modifizierten Methode durchgeführt, die auf der Elektronenübertragung von reduzierter Ascorbinsäure auf Eisen-III-Ionen in saurer Lösung basiert. Das so entstandene zweiwertige Eisen (Fe^{2+}) bildet mit α,α -Bipyridyl einen Chelat-Komplex, dessen Extinktion bei 525 nm photometrisch bestimmt werden kann. Um den Gehalt an Dehydroascorbat mit erfassen zu können, wird dieses zuvor mit Dithiotreit (DTT) zu Ascorbinsäure reduziert. Auf diese Weise wird der Gehalt an Gesamt-Ascorbat bestimmt. Überschüssiges Reduktionsmittel, das auch Elektronen auf Fe^{2+} übertragen würde, wird durch Zugabe von N-Ethylmaleimid (NEM) aus dem Reaktionsansatz entfernt.

Für die Untersuchung wurde 0,2 g gefrorenes Blattmaterial mit 3 ml 0,1 N HCl versetzt, homogenisiert (1:15) und anschließend für 20 Minuten bei 4 °C mit 16000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, in ein Schnappdeckelglas pipettiert und in Eis gestellt.

Zu jeder Messreihe wurde eine Eichreihe erstellt. Von 5 Ascorbinsäurestandards im Konzentrationsbereich von 0-1 mM wurde (wie die Proben) der Gesamt-Ascorbinsäuregehalt bestimmt. (Messungen haben gezeigt, dass die Steigung der Eichkurve der reduzierten und der gesamten Ascorbinsäure gleich ist.) Für die Eichreihe der Infiltrate wurden 5 Ascorbinsäurestandards im Konzentrationsbereich von 0-100 μM eingesetzt.

Pipettierschema:

Lösung	Gesamtascorbat	Reduziertes Ascorbat
NaOH-Puffer (ml)	0,2	0,2
Blattextrakt (ml)	0,2	0,2
DTT (ml)	0,1	
DTT+NEM (ml)		0,2
15 min inkubieren (Raumtemp.)		
NEM (ml)	0,1	
30 sec inkubieren (Raumtemp.)		
Bipyridyl (ml)	1	1
Whirlen und gleichzeitig FeCl ₃ zugeben	0,2	0,2
60 min bei 37 °C inkubieren		
30 min in Raumtemperatur abkühlen lassen		

Aus den Standardkonzentrationen und den zugehörigen Extinktionen der Eichreihe wurde eine Regressionsgerade ermittelt, über deren Steigung die Probenkonzentrationen in mmol / l (die Eichgerade für die Infiltration lag im µmol / l Bereich) berechnet wurden. Folgende Formeln wurden für die Umrechnung in mg / g FG (bei der Infiltration entsprechend in µg / g FG) angewendet:

$$\text{mmol / l Ascorbinsäure} = \frac{(\text{Extinktion} + \text{Achsenabschnitt})}{\text{Steigung}} \quad (14)$$

$$\text{mg Ascorbinsäure / g FG} = \left(\frac{\frac{\text{mmol}}{\text{l}} * \text{Probenvolumen (l)}}{\text{gr FG}} \right) * 198,1 \quad (15)$$

Bei der Infiltration mußte zusätzlich der Verdünnungsfaktor (3) mit in der Berechnung berücksichtigt werden. Zur Bestimmung des Ascorbinsäuregehaltes im Trockengewicht wurde mit bekanntem Verhältnis TG / FG multipliziert.

Verwendete Reagenzien

Phosphatpuffer 150 mM Na-K-Phosphatpuffer, pH 7,5

NaOH-Puffer 1,667 ml 6 N NaOH mit dem Phosphatpuffer auf 100 ml auffüllen

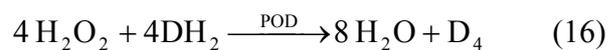
DTT-Lösung	10 mM; 0,01524 g Dithiotreit mit Aqua bidest. auf 10 ml auffüllen
NEM-Lösung	0,5 % (w/v); 0,5 g N-Ethylmaleimid mit Aqua bidest. auf 100 ml
DTT + NEM	1:1 mischen
Bipyridyl-Lösung	
Ethanol	70 %; 70 ml Ethanol absolut + 26 ml H ₂ O
H ₃ PO ₄	42,5 %; 1:1 mit dem 85 %igen verdünnen
TCA-Lösung	10 % (w/v); 10 g TCA auf 100 ml auffüllen
	0,2 g Bipyridyl in 10 ml Ethanol lösen +10 ml H ₃ PO ₄ + 10 ml TCA
FeCl ₃ -Lösung	3 % (w/v); 5 g FeCl ₃ x 6 H ₂ O mit Aqua bidest. auf 100 ml
AsA-Stammlösung	0,1 mg / ml in 0,1 N HCl

Verwendete Geräte

Analysewaage	Mettler, Modell AT 200
Wasserbad	Julabo, Modell U3
Spektrophotometer, Fa. Beckmann	Modell DU 6
Beckman-Zentrifuge	Model J2-21

Bestimmung unspezifischer Peroxidasen

Die unspezifischen Peroxidasen (POX) werden durch die Abnahme des H₂O₂ oder des H₂-Donators, sowie durch die Entstehung der dehydrogenierten Verbindung, wie zB. des Guajacols bestimmt:



D4 = Oktadehydrotetraquajacol

Für die Untersuchung wurden 0,2 g gefrorenes Blattmaterial mit 3 ml Extraktionspuffer versetzt, homogenisiert und 25 Minuten in 4 °C bei 16000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Extinktionszunahme aufgezeichnet und als Graphik festgehalten. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach der Formel:

$$\text{Aktivität (U/g FG)} = \frac{\frac{\text{Küvettenvolumen} * 4}{\epsilon * d * \text{Probevolumen}} * \frac{\Delta E}{\text{min}} * VF * \text{Puffervolumen}}{\text{g FG}} \quad (17)$$

Extinktionskoeffizient für Guajacol: $\epsilon = 25,5 \text{ cm}^2 / \mu\text{Mol}$

Bei der Infiltration musste zusätzlich der Verdünnungsfaktor (VF=3) mit in der Berechnung berücksichtigt werden.

Reagenzien

100 mM K-PO ₄ Puffer	Lösung a: KH ₂ PO ₄ ; 1,361 g in 100 ml Aqua dest. Lösung b: K ₂ HPO ₄ ; 2,282 g in 100 ml Aqua dest.; auf pH = 7 einstellen (gleicher Puffer für Extraktion und Messung)
28 mM Guajacol	25 µl (35 mg) in 10 ml K-PO ₄ Puffer lösen
12,3 mM H ₂ O ₂	0,014 ml in 10 ml Aqua dest.

Pipettierschema:

Substanz	Pipettiermenge (µl)
K-PO ₄ Puffer	1500
Guajacol	250
Extrakt	100
H ₂ O ₂	25

Bestimmung der Ascorbat-Peroxidase-Aktivität

Dazu wurde die Methode von MANDERSCHIED & JÄGER (1991), ASADA (1992) und NAKANO & ASADA (1987) übernommen. Das Enzym katalysiert die H₂O₂ Entgiftung. Als Substrat (also als H₂-Lieferant) dient das Reduktionsmittel Ascorbinsäure, das in seiner reduzierten Form ein Absorptionsmaximum im nahen UV-Bereich (289 nm) zeigt und so quantitativ photometrisch bestimmt werden kann.

0,2 g gefrorenes Blattmaterial wurden mit 3,5 ml Extraktionspuffer versetzt und nach Zugabe von 10 % PVP homogenisiert und im Anschluss für 20 Minuten bei 4 °C mit 16000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für 4 h bei 4 °C dialysiert.

Berechnung der Enzymaktivität

$$\text{Aktivität (U/ g FG)} = \frac{\frac{\text{Küvettenvolumen} * 1000}{\varepsilon * d * \text{Probenvolumen}} * \frac{\Delta E}{\text{min}} * VF * \text{Puffervolumen}}{\text{g FG}} \quad (18)$$

Extinktionskoeffizient für Ascorbat $\varepsilon = 2,8 \text{ cm}^2 / \mu\text{Mol}$

Bei der Infiltration musste zusätzlich der Verdünnungsfaktor (VF=3) mit in der Berechnung berücksichtigt werden.

Pipettierschema:

Lösung	Pipettiermenge (µl)
Puffer	600
EDTA	100
Ascorbat	100
Extrakt	100
H ₂ O ₂	100

Reagenzien für Extraktion und Dialyse:

Extraktionspuffer

50 mM Tris-HCl 0,6057 g Tris (Tris (hydroxymethyl) aminomethane) auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen und mit HCl auf pH 7,8 einstellen
 1 mM Ascorbat 0,01761 g auf 100 ml Puffer
 10 % Sorbit

Dialysepuffer

50 mM Tris-HCl 18,171 g Tris in 3 l Aqua dest. und mit HCl auf pH 7,8 einstellen
 1 mM Ascorbat 0,5283 g in 3 l Puffer
 5 % Sorbit

10 % PVP (Polyclar)

Reagenzien für die Messung der Enzymaktivität:

100 mM NaPO₄-Puffer Lsg. a: Na₂HPO₄; 1,7799 g in 100 ml Aqua dest. lösen
 Lsg. b: NaH₂PO₄; 1,56 g in 100 ml Aqua dest. lösen
 Bei pH 7 einstellen
 1 mM EDTA 0,00931 g in 25 ml Puffer
 5 mM Ascorbat 0,0099 g in 10 ml Aqua dest.
 1 mM H₂O₂ 10 µl 30 % H₂O₂ auf 100 ml Aqua dest.

2.3.7 Apoplasten-Fluid

Die Vakuum-Infiltrations-Methode (HUSTED & SCHJOERRING, 1995) ist entwickelt worden, um eine relativ reine Apoplastenflüssigkeit ohne große cytoplasmatische Verunreinigungen zu gewinnen.

Die Blätter wurden mit einem Korkbohrer in Stanzstücke geschnitten und gewogen (Mettler AT). Die Stanzstücke wurden in eine 350 mOsm (0,28 M) isotonische Sorbitol-Lösung (bei 10 °C) eingetaucht und mit einer speziell dafür konstruierten Halterung am Boden des Infiltrationslösungs-Gefäßes fixiert. Mit einer Vakuumpumpe (Typ Heraeus) wurde mit bis zu 100 Torr infiltriert, wobei der Druck sehr langsam gesenkt wurde. Nachdem die Blätter dem Vakuum für 1 min ausgesetzt waren, wurde der Druck langsam wieder aufgebaut. Das ganze dauerte ca. 4,5 min. Nach der Infiltration wurde die Flüssigkeit von den Blättern abgetupft und diese erneut gewogen. Anschließend wurden die Stanzstücke einzeln in Alufolie gewickelt und in speziellen Zentrifugenröhrchen bei 4 °C für 25 min und bei 3024 g (Beckman-Zentrifuge Model J2-21) zentrifugiert.

Die Reinheit der Extrakte, um Verunreinigungen durch Cytoplasma festzustellen, wurde durch Messung der Aktivität der Malatdehydrogenase (MDH) kontrolliert. Bei weniger als 1 % MDH-Aktivität wurde die Probe als ausreichend rein definiert.

Die **Ascorbat**-Bestimmung erfolgte nach Mischung des Apoplastenfluids mit 0,1 N HCl (1:2); die **Ascorbatperoxidase**-Bestimmung wurde nach Mischung des Fluids im Verhältnis 1:2 mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 % (w/v) Sorbitol und 1 mM Ascorbat durchgeführt. Die **Guajacol-Peroxidase**-Aktivität wurde nach versetzen des Fluids mit einem 100 mM Na₂HPO₄ / KH₂PO₄-Puffer, pH 7, ebenfalls im Verhältnis 1:2 gemessen. Die Apoplastenfluid-Puffer-Gemische wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und entsprechend den Angaben für die Gesamtblattanalysen (2.3.6) weiter bearbeitet.

2.3.8 Blattanatomie

Um die Blattanatomie der beiden Klonen zu vergleichen wurde ihr Blattaufbau mit dem Rasterelektronenmikroskop (Philips SEM XL20) untersucht, das zusätzlich mit einem Röntgenstrahlhalbleiterdetektor "EDU-Leap Detector" (zur EDAX bzw. Röntgenspektalanalyse) ausgerüstet war. Mit der EDAX (Energiedispersive Röntgenmikroanalyse) kann die Elementkonzentration und -zusammensetzung in mikrometergrossen Proben gemessen werden. Das Messprinzip wird bei PLATTNER & ZINGSHEIM (1987) ausführlich beschrieben. Ein typisches EDAX Spektrum ist in Abb. 12 dargestellt. Im Rasterelektronenmikroskop erfolgt die Informationserfassung und -verarbeitung wie bei EGGERT (2005) erläutert.

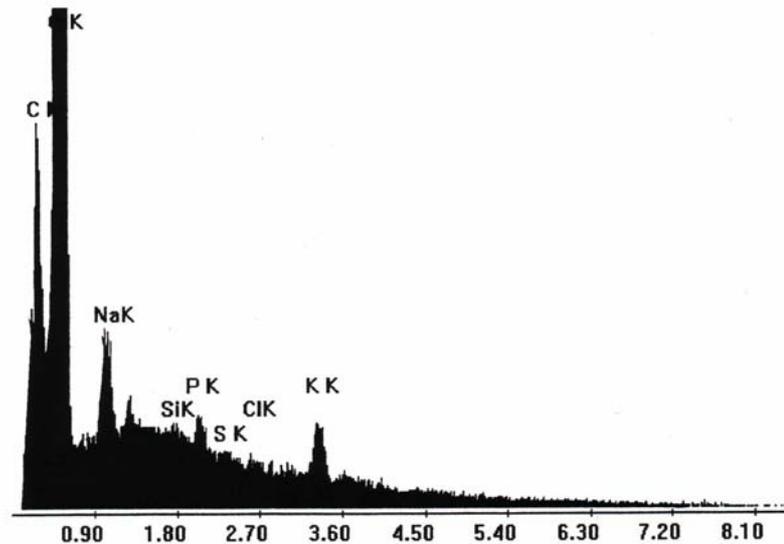


Abb. 12: Typisches EDAX-Spektrum mit den elementenspezifischen Peaks.

Probenvorbereitung und Elementanalysen

Die Analysen wurden in der Zentralen Biotechnischen Betriebseinheit der JLU durchgeführt. Ein Teil der Pflanzen war zuvor einer 14tägigen Ozonexposition in den *open-top*-Kammern ausgesetzt worden. Es wurden zunächst Proben aus den Blattspreiten mit dem Skalpell herausgeschnitten und durch rasche Abkühlung mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C kryofixiert. Das tiefgefrorene Material wurde oberflächlich quergebrosen (Radialbruch) und anschließend in das Vakuum des Rasterelektronenmikroskops (Philips, SEM XL20) übertragen. Für weitere Details siehe WARLEY (1997).

Es wurden Messungen in gefrorenem und in gefriergetrocknetem Zustand (Proben wurden im Hochvakuum gefriergetrocknet) durchgeführt. Im gefrorenen Zustand wird das Wasser und der darin gelöste Sauerstoff mitgemessen. In den gefriergetrockneten Proben wird nur das gemessen, was in der verbleibenden Matrix gebunden ist. Die eingestellten Bedingungen erlaubten Messungen bei minimaler Probenbelastung. Für ein Zeitfenster von bis zu 45 Minuten waren dabei gleichbleibende Messbedingungen gewährleistet (HINDE et al., 1998; KOYRO, 2000). Es erfolgte eine thermische Ätzung (Abbildung 13). Anschließend wurden Messungen sowohl an den oberen und unteren Epidermiszellen, als auch an den Palisaden- und Schwammparenchymzellen durchgeführt. Gemessen wurde der Vakuoleninhalt. Aufgrund methodischer Probleme (Auflösungsvermögen bzw. minimal erfassbares Probenvolumen) war eine Messung direkt im Apoplasten (Zellwand) nicht möglich (KÖSEGARTEN & KOYRO, 2001).

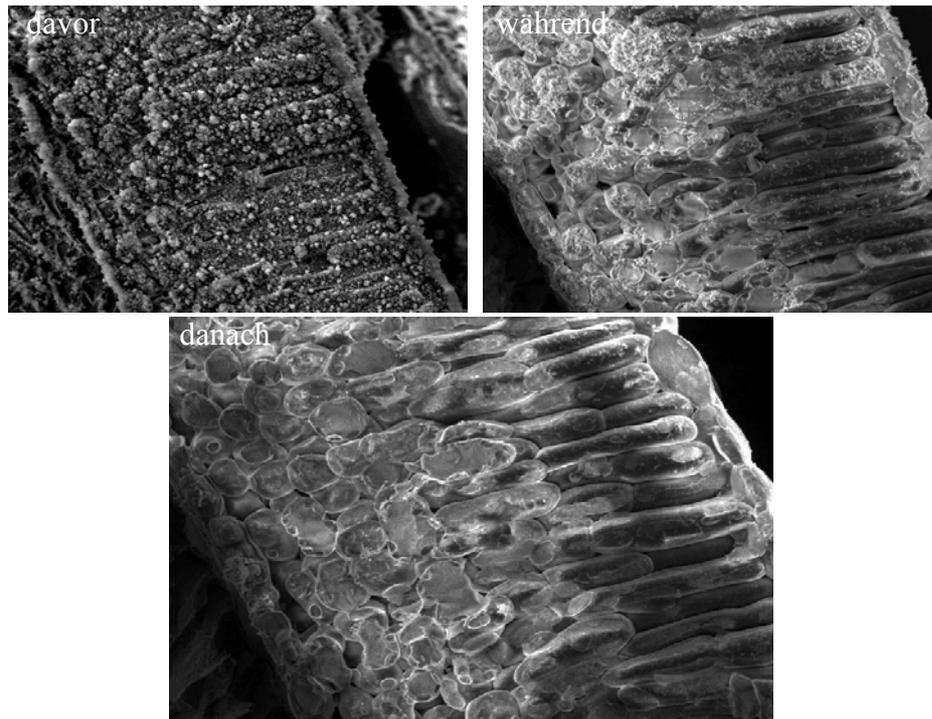


Abb. 13: Die drei Phasen der Gefrierätzung im Rasterelektronenmikroskop

Der Zeitraum einer Analyse betrug 100 *live seconds* (Nettosekunden; "die in 100 Sekunden *real* erzeugte Röntgenstrahlung"). Der Arbeitsabstand zwischen Probenoberfläche und dem KEVEX-Si/Li-Röntgenhalbleiterdetektor mit Beryllium Fenster (Detektorspannung 500 V) betrug 12 mm. Die Beschleunigungsspannung betrug 15 kV, der Strahlstrom 150 μA , der Kondensorstrom 0,8 bis 1,0 A und der Durchmesser der Objektivblende 100 μm . Die Elementzusammensetzung und -konzentration der Makro- und Mikroelemente C, O, N, Na, Mg, P, S, Cl, K und Ca wurde mit dem geräteeigenen Auswertungsprogramm bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte über die gemessenen Gewichtsprozent der einzelnen Elemente.

2.4 Datenauswertung und Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm Sigma Stat 2.0 durchgeführt, dessen Ergebnisse durch das Graphikprogramm Plot IT 3.20h für Windows 95/NT graphisch dargestellt wurden. Die Textverarbeitung erfolgte durch das Textverarbeitungsprogramm Winword 97. Mit Hilfe der zwei- und dreifaktoriellen Varianzanalyse und dem Tukey-Test wurden die Mittelwertunterschiede auf Signifikanzen überprüft und im Anschluss tabellarisch oder graphisch dargestellt. Die signifikanten Unterschiede wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Die Unterschiede in den Ergeb-

nissen der einzelnen Jahre wurden für den R-Klon mit einem Buchstaben und für den S-Klon mit einer Ziffer versehen. Mindestens ein gemeinsamer Buchstabe oder Ziffer zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen gibt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Klimatische Bedingungen und Ozonexposition

Der Vergleich der Ozonbelastung in den vier Untersuchungsjahren (Tabellen 3 bis 4) zeigt, dass eine O₃-Konzentration von 100 ppb nur bei der ersten Exposition des Jahres 1996 und bei der jeweils letzten Exposition der Jahre 1997 und 1998 überschritten wurde. Das Jahr 1999 hatte während der gesamten Expositionsperioden die niedrigsten Ozonkonzentrationen. Nur innerhalb der zweiten Exposition wurden 80 ppb überschritten. Der Vergleich der "mittleren" Temperaturdaten zeigt, dass keine Unterschiede zwischen den Jahren zu sehen sind. Ähnliches gilt auch für die relative Luftfeuchtigkeit, hier sind nur kleine Unterschiede erkennbar. 1998 war das Jahr mit dem meisten Regen und den meisten Regentagen. Weitere charakteristische Daten sind für jedes Jahr getrennt im Anhang 1 zu finden.

Tabelle 3: Einige Klimadaten für alle Expositionen des Jahres 1996 und 1997

	1996	1. Exposition	2.Exposition	3.Exposition	4.Exposition
Ozone (ppb)	24h mittelwert	32	22	24	21
	Tagesmaxwert	64	43	51	49
	AOT40	4112	596	2093	1366
Lufttemperatur (°C)	Tagesmittelwert	16	15	17	14
	Tagesmaxwert	22	19	23	19
	Tagesminwert	9	10	10	8
rel. Feuchtigkeit (%)	Tagesmittelwert	78	80	79	81
	Tagesminwert	58	61	56	62
Niederschlag (mm)	Summe	23,3	45,6	50,4	38,4
Strahlung (W/m ²)	Tagesmittelwert	441	328	386	325
	1997				
Ozone (ppb)	24h mittelwert	31	23	29	22
	Tagesmaxwert	55	48	59	54
	AOT40	2433	1304	4057	2031
Lufttemperatur (°C)	Tagesmittelwert	15	16	19	17
	Tagesmaxwert	21	21	25	23
	Tagesminwert	8	11	12	10
rel. Feuchtigkeit (%)	Tagesmittelwert	74	80	71	75
	Tagesminwert	49	57	45	52
Niederschlag (mm)	Summe	45,3	55,1	10	18,4
Strahlung (W/m ²)	Tagesmittelwert	421	371	442	341

Tagesmaxwert - Tagesminwert: Mittelwert des täglichen Maximalwertes bzw. Minimalwertes

Tabelle 4: Einige Klimadaten für alle Expositionen der Jahre 1998 bis 1999

	1998	1. Exposition	2.Exposition	3.Exposition	4.Exposition
Ozone (ppb)	24h mittelwert	27	25	28	29
	Tagesmaxwert	50	47	61	60
	AOT40	1813	1158	3102	3667
Lufttemperatur (°C)	Tagesmittelwert	14	16	17	16
	Tagesmaxwert	20	21	24	21
	Tagesminwert	8	11	11	10
rel. Feuchtigkeit (%)	Tagesmittelwert	78	79	75	75
	Tagesminwert	56	57	50	52
Niederschlag (mm)	Summe	82,2	40,3	24,7	71,8
Strahlung (W/m ²)	Tagesmittelwert	368	348	385	320
	1999				
Ozone (ppb)	24h mittelwert	29	30	28	23
	Tagesmaxwert	53	58	54	47
	AOT40	1971	3156	2393	1157
Lufttemperatur (°C)	Tagesmittelwert	15	16	19	17
	Tagesmaxwert	21	22	25	22
	Tagesminwert	8	9	13	11
rel. Feuchtigkeit (%)	Tagesmittelwert	76	71	73	76
	Tagesminwert	52	45	50	52
Niederschlag (mm)	Summe	28,9	11,5	70,3	45,6
Strahlung (W/m ²)	Tagesmittelwert	404	426	412	357

Tagesmaxwert - Tagesminwert: Mittelwert des täglichen Maximalwertes bzw. Minimalwertes

3.2 Einfluss von O₃ auf die Produktion oberirdischer Biomasse

3.2.1 Ertragserhebungen im Freiland

Die Gesamt-Biomasse der Klone wird in der Abbildung 14 vorgestellt. 1996 war das Jahr mit den geringsten Biomasseerträgen. Tendenziell ist eine Abnahme der Biomasse im Laufe des einzelnen Jahres zu verzeichnen. Zusätzlich gab es in der zweiten Exposition der Jahre 1997 und 1999 eine signifikante Abnahme der Biomasse des S-Klones im Vergleich zum R-Klon. Unterschiede zwischen den Jahren waren nur bei der zweiten Exposition vorhanden. Sowohl der resistente als auch der sensitive Klon hatten im Jahr 1996 eine signifikant verminderte Biomasseproduktion im Vergleich zu den übrigen Jahren. Für eine differenzierte Betrachtung wurde die Gesamt-Biomasse aufgeschlüsselt nach Blüten, Blätter, Stengel und Stolonen.

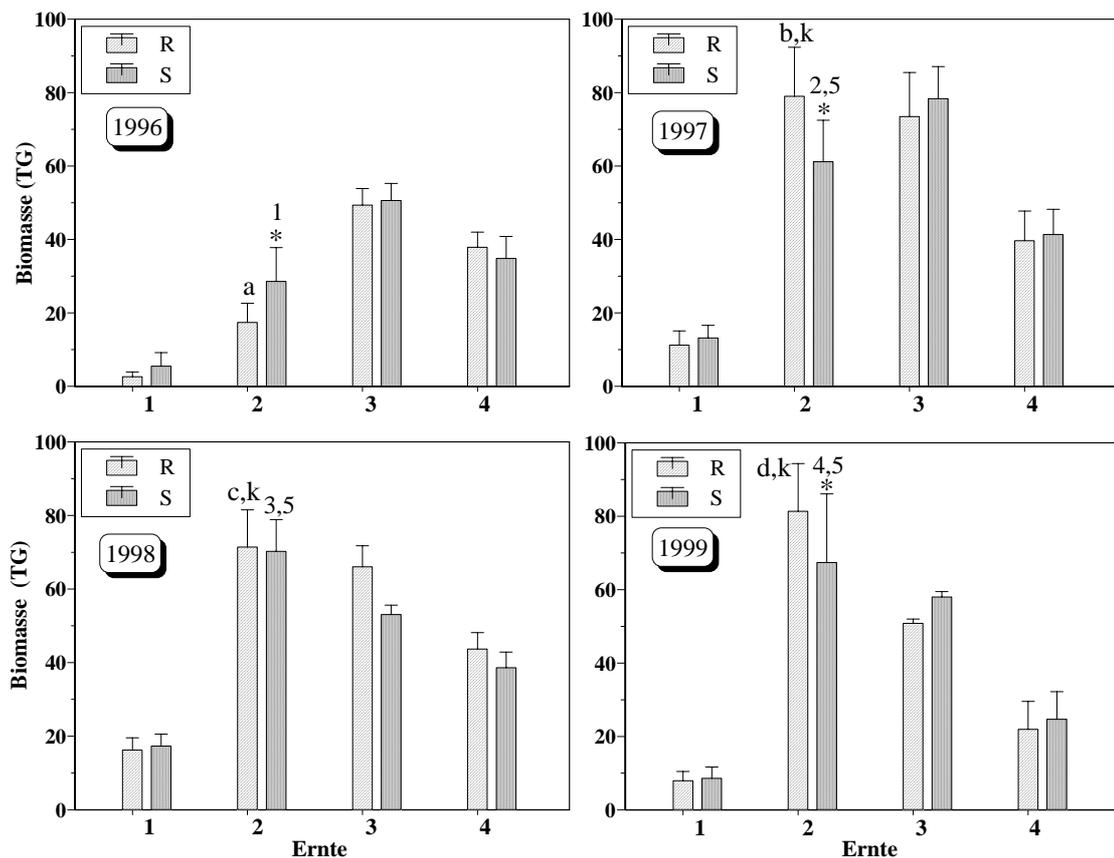


Abb. 14: Gesamtbiomasse

(Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Klee-Klonen innerhalb einer Exposition wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede in den einzelnen Jahren zwischen den einzelnen Ernten wurden für den R-Klon mit einem Buchstaben und für den S-Klon mit einer Ziffer versehen. Mindestens ein gemeinsamer Buchstabe oder Ziffer zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen gibt)

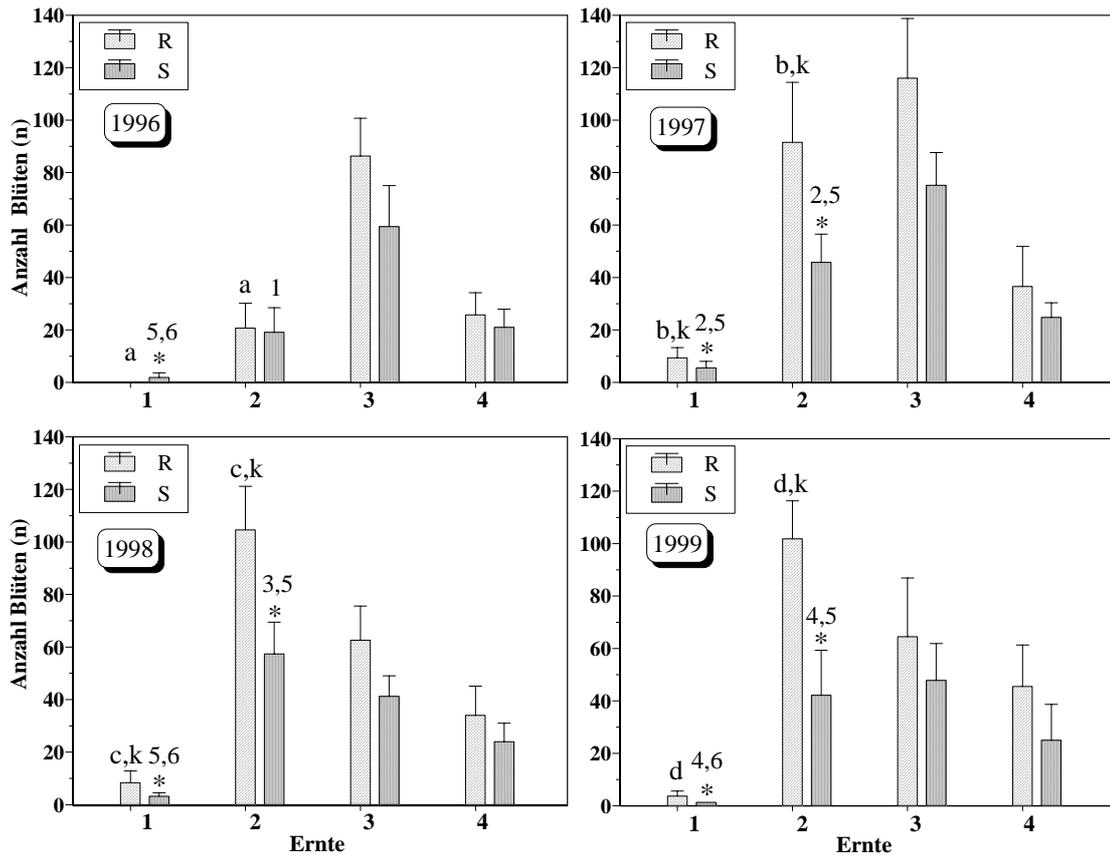


Abb. 15: Anzahl der Blüten

(Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Klee-Klonen innerhalb einer Exposition wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede in den einzelnen Jahren zwischen den einzelnen Ernten wurden für den R-Klon mit einem Buchstaben und für den S-Klon mit einer Ziffer versehen. Mindestens ein gemeinsamer Buchstabe oder Ziffer zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen gibt)

In den Abbildungen 15 und 16 wird die Anzahl und die Biomasse der gebildeten Blüten pro Klon und Ernte für alle vier Jahre dargestellt. Für diese Parameter gibt es eindeutige Unterschiede. Die Pflanzen wiesen im Jahr 1996 insgesamt die geringste Anzahl Blüten im Vergleich zu den folgenden Jahren auf. Die Anzahl der Blüten des sensitiven Klones war bei fast allen Ernten kleiner als die des resistenten Klones. Bereits bei der ersten Ernte in den Jahren 1997-1999 unterschied sich der sensitive Klon signifikant von dem resistenten. Diese verminderte Blütenbildung wurde auch bei den folgenden Expositionen gefunden. Eine signifikant verminderte Blütenbildung zeigte sich aber nur bei der zweiten Ernte, bei der dritten und vierten Ernte können nur Tendenzen abgelesen werden.

Es gab allerdings auch zwischen den Jahren Unterschiede zwischen den verschiedenen Expositionen. Im Jahr 1996 wies der R-Klon (in der ersten Exposition) keine Blüten auf, was ihn von den anderen Jahren signifikant unterscheidet. Auch im Jahr 1999 unterschied sich der R-Klon zu allen anderen Jahren der gleichen Exposition. Im Jahr 1996 bei der zweiten Exposition erwies der resistente Klon die signifikant niedrigste Anzahl

der Blüten im Vergleich zu den nachfolgenden Jahren. Das gleiche gilt für den selben Zeitraum auch für den sensitiven Klon.

Wie zu erwarten, war auch die Biomasse der Blüten des sensitiven Klones signifikant geringer als die des resistenten, was sehr deutlich bei der ersten und zweiten Ernte der Jahre 1997 bis 1999 zu sehen war. Im Jahr 1999 erreichte der resistente Klon bei der zweiten Exposition den signifikant höchsten Wert im Gegensatz zu dem sensitiven Klon, der in der gleichen Expositionsperiode den geringsten Wert aufwies.

Im Jahr 1996 erwies der resistente Klon bei der zweiten Exposition den signifikant geringsten Wert im Vergleich zu den anderen Jahren. Zusätzlich war die Biomasse der Blüten des resistenten Klones bei der gleichen Exposition im Jahr 1998 signifikant geringer als die des Jahres 1999. Der sensitive Klon zeigte bei der zweiten Exposition signifikante Unterschiede nur zwischen den Jahren 1996 und 1999.

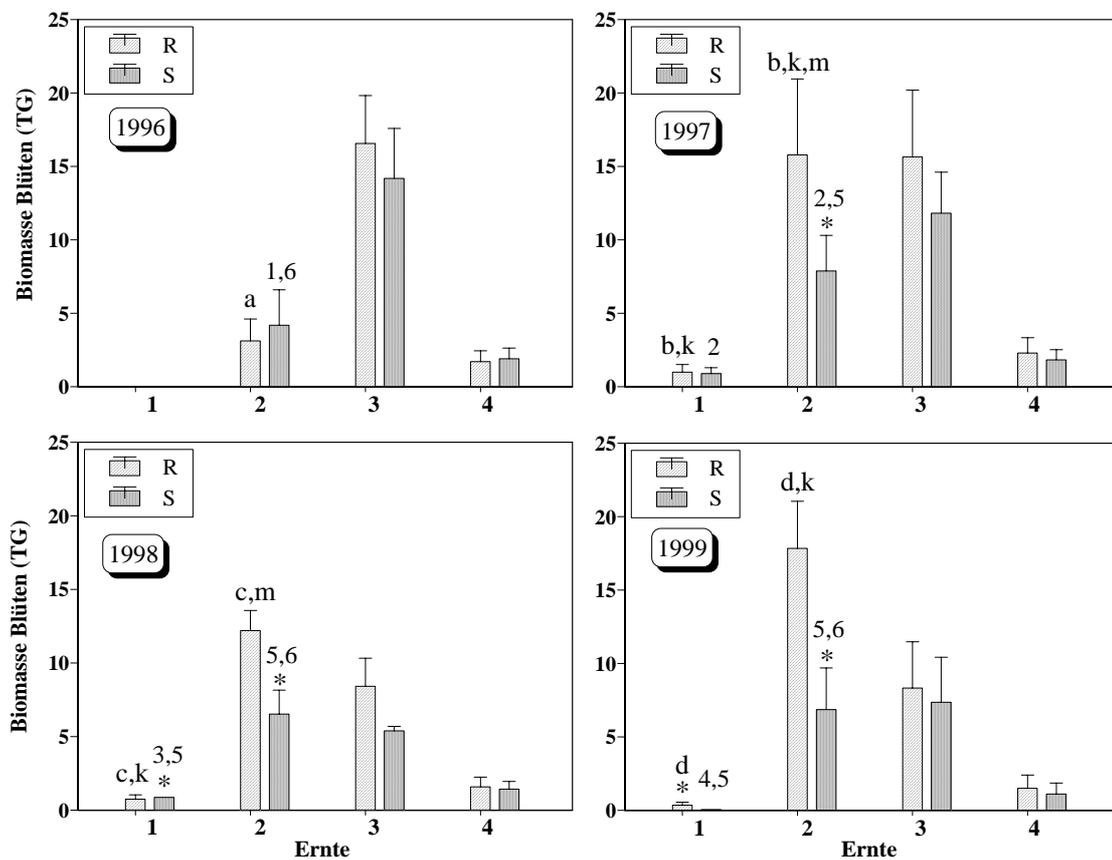


Abb. 16: Biomasse der Blüten

(Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Klee-Klonen innerhalb einer Exposition wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede in den einzelnen Jahren zwischen den einzelnen Ernten wurden für den R-Klon mit einem Buchstaben und für den S-Klon mit einer Ziffer versehen. Mindestens ein gemeinsamer Buchstabe oder Ziffer zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen gibt).

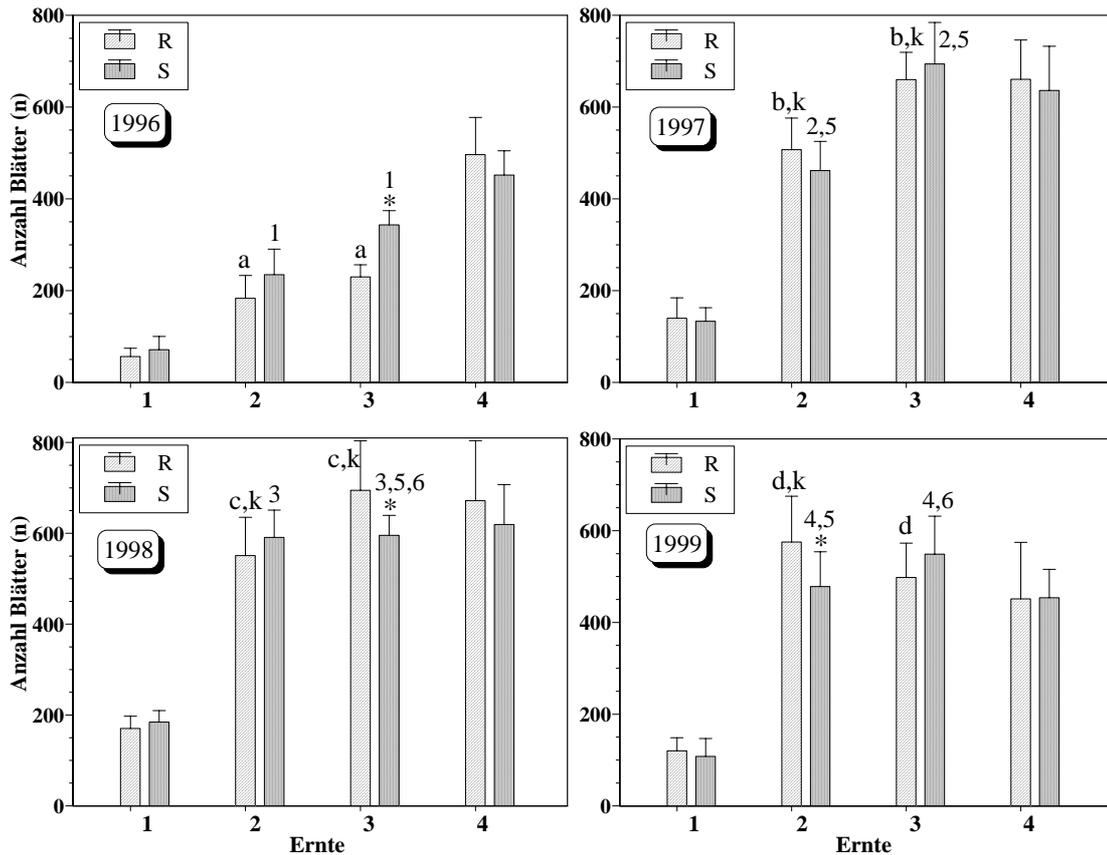


Abb. 17: Anzahl grüner Blätter

(Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Klee-Klonen innerhalb einer Exposition wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede in den einzelnen Jahren zwischen den einzelnen Ernten wurden für den R-Klon mit einem Buchstaben und für den S-Klon mit einer Ziffer versehen. Mindestens ein gemeinsamer Buchstabe oder Ziffer zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen gibt)

Im Jahr 1996 war die Anzahl der Blätter am geringsten (Abb. 17). Die Unterschiede wurden ab der zweiten Ernte deutlich: Sie sind signifikant im Vergleich zu den folgenden Jahren bei beiden Klonen. Bei dieser Exposition zeigte der S-Klon einen signifikanten Unterschied zwischen den Jahren 1998 und 1999. Zwischen den Klonen waren signifikante Unterschiede zu erkennen. Bei der jeweils dritten Exposition waren zwei signifikante Unterschiede zwischen den zwei Klee-Klonen zu sehen. Zuerst im Jahr 1996 und ein zweites Mal im Jahr 1998. 1996 war eine Zunahme und 1998 eine Abnahme der Blätteranzahl des sensitiven Klonen erkennbar. Eine Abnahme der Blätteranzahl des sensitiven Klonen wurde auch bei der zweiten Exposition im Jahr 1999 beobachtet. Im Jahresvergleich zeigte der R-Klon einen signifikanten Unterschied zwischen 1996 und 1999. Die Ergebnisse dieser beiden Jahre sind signifikant unterschiedlich zu den anderen Jahren und auch im Vergleich untereinander. Bei der vierten Ernte waren fast alle Werte gleich. Es waren keine eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Klonen sichtbar.

Insgesamt gesehen gab es nur in zwei Jahren (im Jahr 1998 in der dritten Exposition und im Jahr 1999 in der zweiten Exposition) eine signifikante Abnahme der Blätteranzahl bei jeweils einer Exposition, so dass man nur von Tendenzen sprechen kann.

Das Vorgehen der Aufschlüsselung der Biomasse im Jahr 1996 unterschied sich im Vergleich zu den anderen Jahren. Im Jahr 1996 wurden die einzelnen Blätter nicht von den Stielen getrennt, so dass ein direkter Vergleich zwischen den Klonen und den Jahren nicht möglich ist. In der Abbildung 18a werden deshalb nur die Jahre 1997-1999 dargestellt.

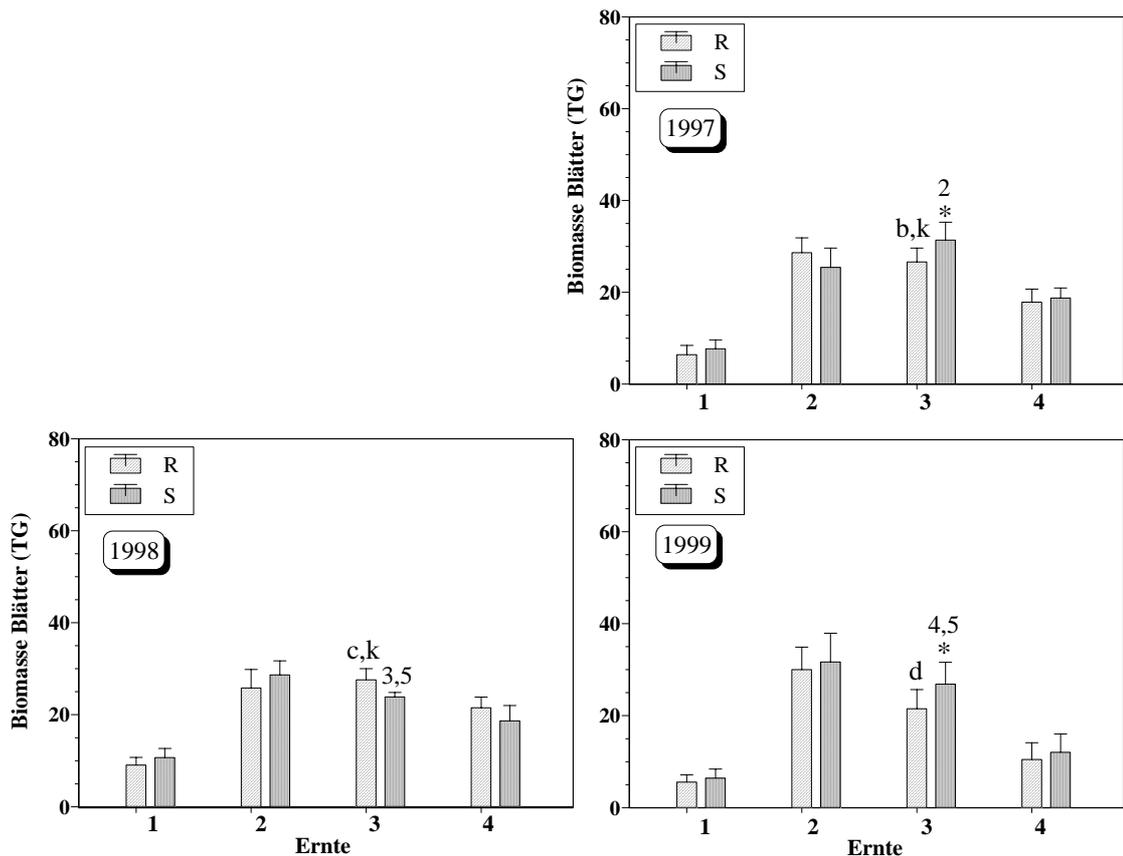


Abb. 18a: Biomasse grüner Blätter

(Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Klee-Klonen innerhalb einer Exposition wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede in den einzelnen Jahren zwischen den einzelnen Ernten wurden für den R-Klon mit einem Buchstaben und für den S-Klon mit einer Ziffer versehen. Mindestens ein gemeinsamer Buchstabe oder Ziffer zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen gibt)

Bis zur zweiten Ernte waren zwischen den Klonen und den Jahren keine Unterschiede zu verzeichnen. Der S-Klon zeigte die Tendenz zu einer höheren Blattbiomasse. Bei der dritten Ernte sowohl im Jahr 1997 als auch im Jahr 1998, war eine Zunahme der Blattbiomasse des sensitiven Klones zu bemerken. Diese Zunahme ist bei beiden Fällen signifikant unterschiedlich zu der des resistenten Klons. Zusätzlich hatte der sensitive Klon im Jahr 1997 bei der dritten Ernte den signifikant höheren Ertrag, als in den vorangegangenen Jahren. Der resistente Klon hatte den signifikant niedrigsten Wert im Jahr

1999. Für die vierte Ernte ist zu bemerken, dass im Vergleich der drei Jahre dies die Exposition mit den geringsten Erträgen, im Vergleich zu der zweiten und dritten Ernte, war. Um auch die Daten des Jahres 1996 zu berücksichtigen, wurden die Blätter und Stiele der jeweiligen Exposition zusammengefügt und in der Abbildung 18b aufgeführt. Es wurde deutlich, dass das Jahr 1996 die geringsten Blättererträge aufwies.

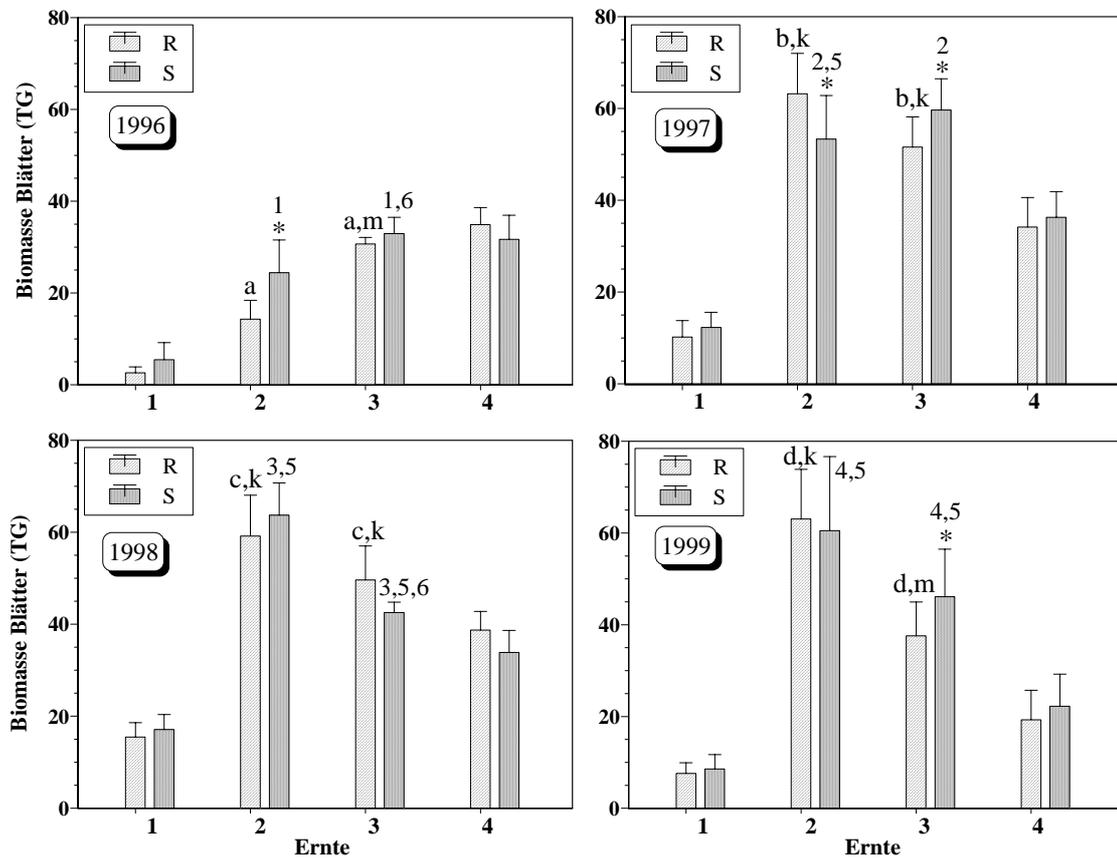


Abb. 18b: Biomasse grüner Blätter

(Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Klee-Klonen innerhalb einer Exposition wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede in den einzelnen Jahren zwischen den einzelnen Ernten wurden für den R-Klon mit einem Buchstaben und für den S-Klon mit einer Ziffer versehen. Mindestens ein gemeinsamer Buchstabe oder Ziffer zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen gibt)

Bei der zweiten Ernte des Jahres 1996 unterschieden sich die Blättererträge sowohl des resistenten als auch des sensitiven Klones signifikant zu den Erträgen der anderen drei Jahre. Es gab 1996 eine signifikante Zunahme und 1997 eine Abnahme im Vergleich der beiden behandelten Klone. Bei der dritten Ernte zeigte sich in den Jahren 1997 und 1999 eine signifikante Zunahme der Blattbiomasse des S-Klons im Gegensatz zu dem R-Klon. Im Jahr 1997 hat der Blätterertrag des S-Klons den signifikant höchsten Wert im Vergleich zu allen anderen Jahren. Der R-Klon erreichte auch bei dieser Ernte den höchsten Wert, der sich signifikant von den Werten der Jahre 1996 und 1999 unter-

scheidet. Bei der vierten Exposition im Jahr 1999 erreichten beide Kleeclone die geringsten Werte, aber insgesamt waren fast keine Unterschiede zu verzeichnen.

Für die Biomasse der Stolone und Stiele (siehe Anhang 2) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen. Es war eine tendenzielle Abnahme der Biomasse im Laufe eines Jahres erkennbar, beide Klone erreichten jedoch fast die gleichen Erträge bei den Ernten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich der sensitive und der resistente Klon nur in der Blütenbildung signifikant unterschieden.

3.2.2 Ertragserhebungen in den *open-top*-Kammern

In den folgenden Abbildungen werden die Erntergebnisse der Kammerversuche von zwei Jahren vorgestellt. Die Kleeclone, die sich in den Kontrollkammern befinden, werden als S-NF oder R-NF (NF= *non filtered*) bezeichnet.

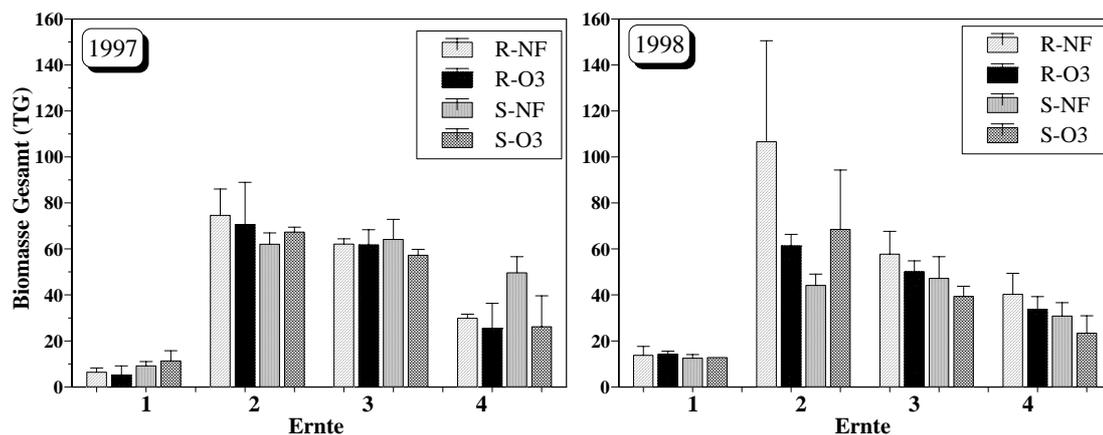


Abb. 19: Gesamtbiomasse

(R-NF und S-NF: Kleeclonen in den Kontrollkammern; R-O₃ und S-O₃: Kleeclonen in den Behandlungskammern)

Hinsichtlich der Gesamt-Biomasse (Abb. 19) sind in den Jahren 1997 und 1998 annähernd die gleichen Erträge erreicht worden. Im Jahr 1998 zeigte der R-NF Klon nur vereinzelt bei der zweiten Exposition einen höheren Ertrag. Im gleichen Zeitraum wies der behandelte sensitive Klon einen höheren Wert auf als der S-NF. In den nächsten Expositionen waren keine bedeutenden Unterschiede zwischen den Behandlungen zu sehen. Die ozonbehandelten Varianten zeigten tendenzielle Minderungen des Ertrages (nicht bei allen Expositionen), aber es konnten keine signifikante Unterschiede festgestellt werden.

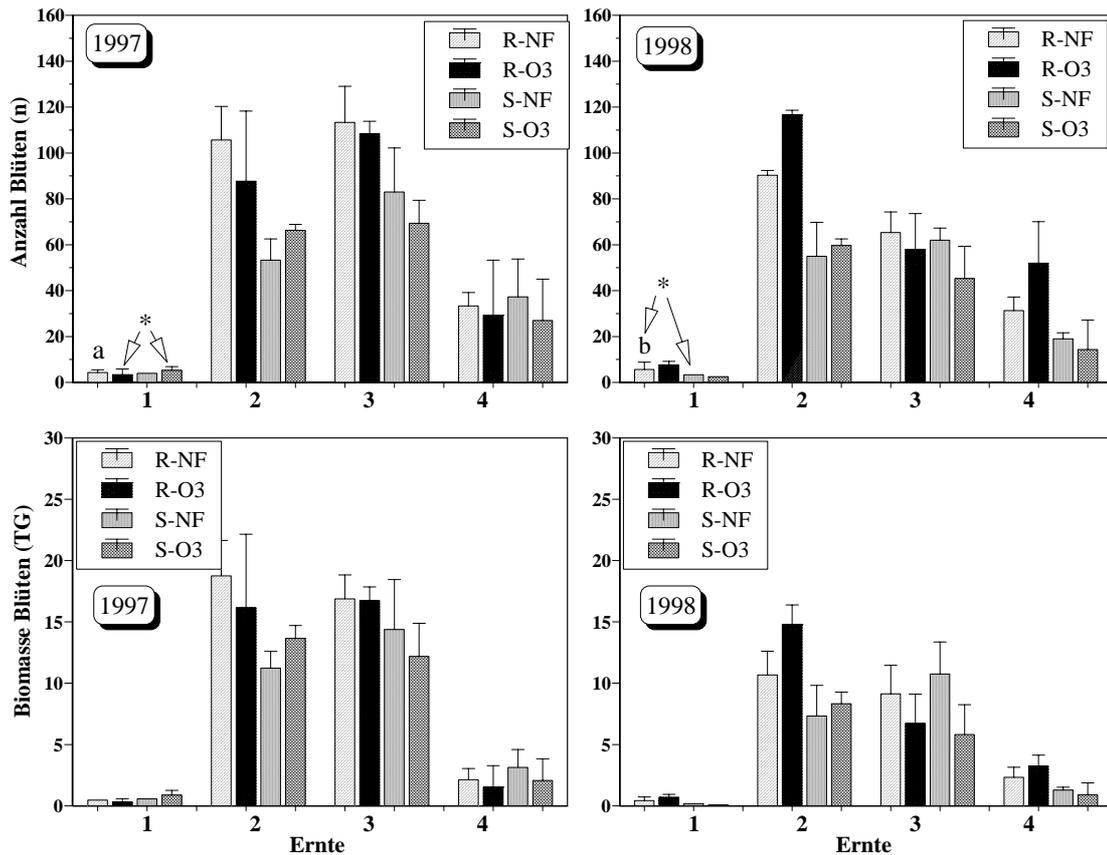


Abb. 20: Anzahl und Biomasse der Blüten

(Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Klee-Klonen innerhalb einer Exposition wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede in den einzelnen Jahren zwischen den einzelnen Ernten wurden für den R-Klon mit einem Buchstaben und für den S-Klon mit einer Ziffer versehen. Mindestens ein gemeinsamer Buchstabe oder Ziffer zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen gibt. R-NF und S-NF: Kleeclonen in den Kontrollkammern; R-O₃ und S-O₃: Kleeclonen in den Behandlungskammern)

Wie auch schon bei den Ergebnissen der Freiland-Versuche können für die Anzahl von Blüten (Abb. 20) eindeutiger Ergebnisse beschrieben werden. Bei diesem Parameter wurden signifikante Unterschiede festgestellt. Diese fanden sich jedoch sowohl im Jahr 1997 als auch 1998 nur bei der ersten Ernte. 1997 hatte der sensitive, ozonbehandelte Klon einen signifikant höheren Wert als der resistente ozonbehandelte. Im Jahr 1998 wies die Kontrolle des resistenten Klones einen signifikant höheren Wert auf, im Vergleich zur Kontrolle des sensitiven Klones. Zusätzlich zeigte der R-NF Klon signifikante Unterschiede zwischen den Jahren 1997 und 1998. Die Tendenz, dass der sensitive Klon unabhängig davon, ob er unter Ozoneinwirkung ist oder nicht, eine deutlich geringere Anzahl von Blüten im Vergleich zu dem resistenten aufweist, wurde besonders im Jahr 1997 deutlich. Zusätzlich zeigte sich, dass der mit Ozon behandelte sensitive Klone bei fast jeder Ernte den niedrigsten Wert hinsichtlich Blütenanzahl aufwies. Für das Trockengewicht der Blüten zeigten sich die gleichen Tendenzen.

Bei der Anzahl der Blätter (Abb. 21) sind keine eindeutigen Unterschiede zu erkennen. Man sah vereinzelt, dass die Anzahl der Blätter bei den behandelten Pflanzen geringfügig kleiner war, als die bei den in Außenluftkonzentration kultivierten Pflanzen. Das war besonders deutlich bei der dritten und vierten Ernte des Jahres 1997 zu erkennen. In der dritten und vierten Exposition des Jahres 1998 wurde deutlich, dass die Anzahl der Blätter der Kontrolle des sensitiven Klones auch beim behandelten resistenten Klon kleiner war. Beim Trockengewicht der Blätter waren kaum Unterschiede zu erkennen. In einigen Fällen wiesen die behandelten Varianten ein höheres Trockengewicht auf als die Kontrollen. Ebenso ist das gegenteilige Ergebnis zu verzeichnen.

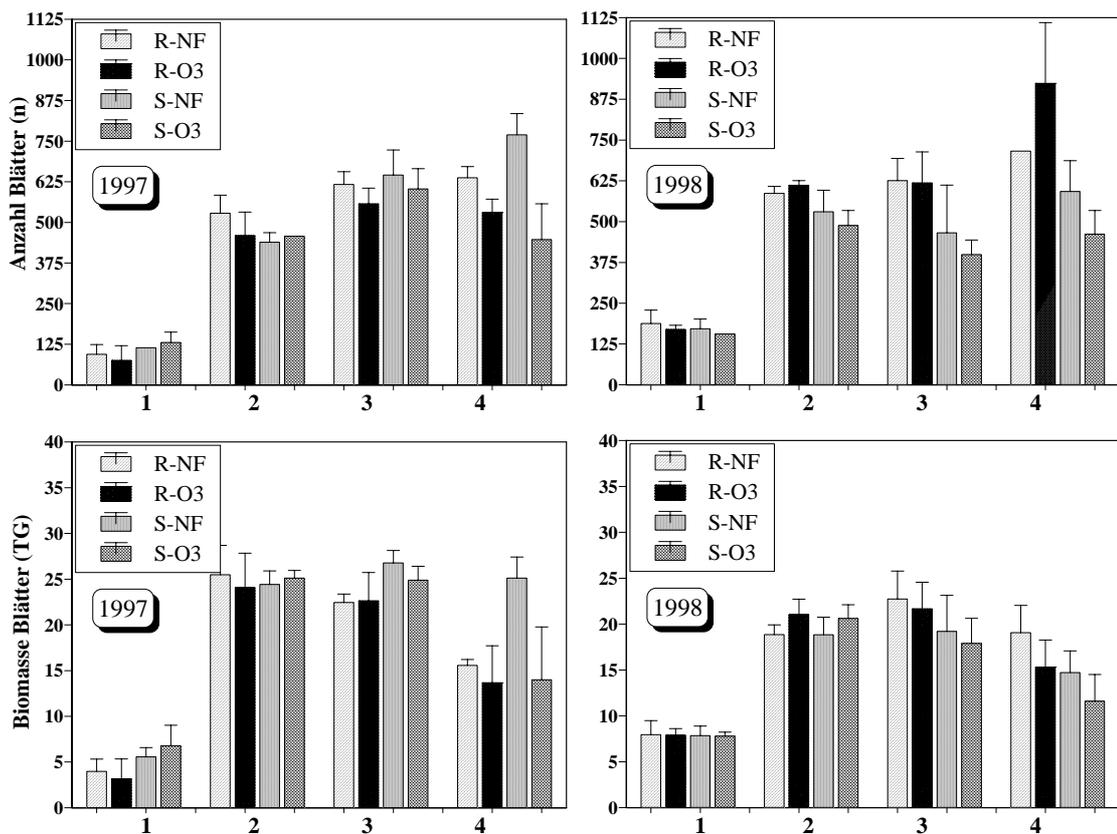


Abb. 21: Anzahl und Biomasse grüner Blätter

(R-NF und S-NF: Kleeclonen in den Kontrollkammern; R-O₃ und S-O₃: Kleeclonen in den Behandlungskammern).

Es sind keine eindeutigen Aussagen für die Biomasse der Stiele und Stolone möglich (siehe Anhang 2). In einigen Fällen erreichten die behandelten Varianten ein höheres Trockengewicht als die Kontrollen, zu anderen Zeitpunkten wiesen die Kontrollen die höchste Biomasse auf.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nur vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen festzustellen waren.

3.3 Abhängigkeit des Biomasseverhältnisses der beiden Klone von der Ozonbelastung im Freiland

Das NC-S/NC-R-Verhältnis der produzierten Biomasse beider Kleeklone diente zur Abschätzung des Einflusses von Ozon auf die Biomasseproduktion. Ein Verhältnis von NC-S zu NC-R kleiner 1 wird als Biomasseverminderung durch Ozoneinwirkung interpretiert (HEAGLE et al., 1994, 1995, 1996). Abbildung 22 zeigt die NC-S/NC-R-Verhältnisse für die Jahre 1996–1999 aufgetragen gegen die zugehörigen AOT40-Werte der entsprechenden Expositionszeiträume. Entsprechend dem ICP-Protokoll (UNECE, 2001) wurde nur die zweite bis vierte Ernte berücksichtigt. Alle Ozonkonzentrationen und klimatischen Parameter wie Temperatur, relative Feuchtigkeit und Strahlung sind der Tabellen 3 und 4 (siehe 3.1) zu entnehmen. Erwartet wurde: umso höher der AOT40-Wert, desto kleiner das S/R Biomasse Verhältnis. Diese Erwartung bestätigte sich allerdings nur in den Jahren 1998 und 1999. Die ersten beiden Jahre zeigten eine gegenteilige (aufsteigende) Tendenz des S/R-Biomasse Verhältnis, d.h. es ist kein eindeutiger Zusammenhang zwischen S/R-Biomasseverhältnis und dem O₃-Expositionsindex erkennbar.

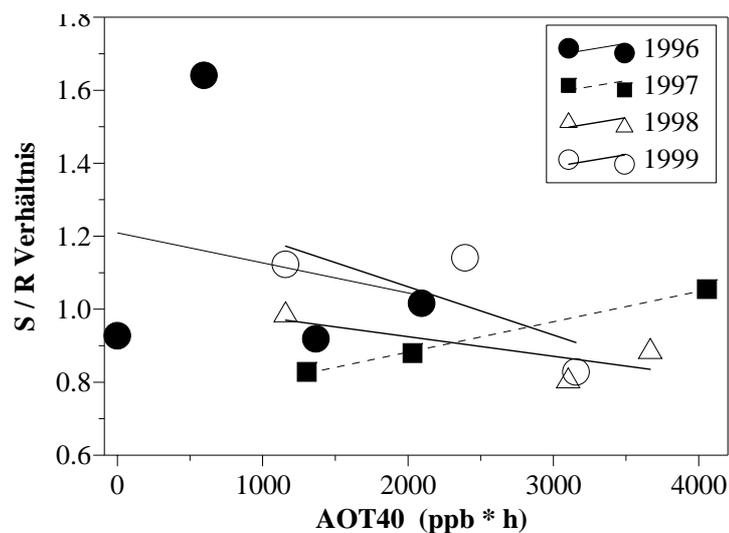


Abb. 22: NC-Sensitive / NC-Resistant Biomasseverhältnis in Abhängigkeit vom AOT40-Index für die Jahre 1996 bis 1999

Anders sah es in den Kammern-Expositionen aus. In Abbildung 23 wird das S/R-Biomasseverhältnis der Kleeklonen exemplarisch nur für das Jahr 1998 dargestellt. Es wird deutlich, dass - obwohl die Ozonkonzentrationen im Freiland und in den NF-Kammern die gleichen waren - die Pflanzen recht unterschiedlich reagierten: Im Jahr 1998 gab es unter Freilandbedingungen eine absteigende Tendenz des S/R-Verhältnisses, was sich aber nicht für die Kontrollkammern bestätigte. Zusätzlich sieht man, dass bei den O₃-kammern - wie erwartet - eine Verminderung des S/R-Biomasseverhältnisses stattfand.

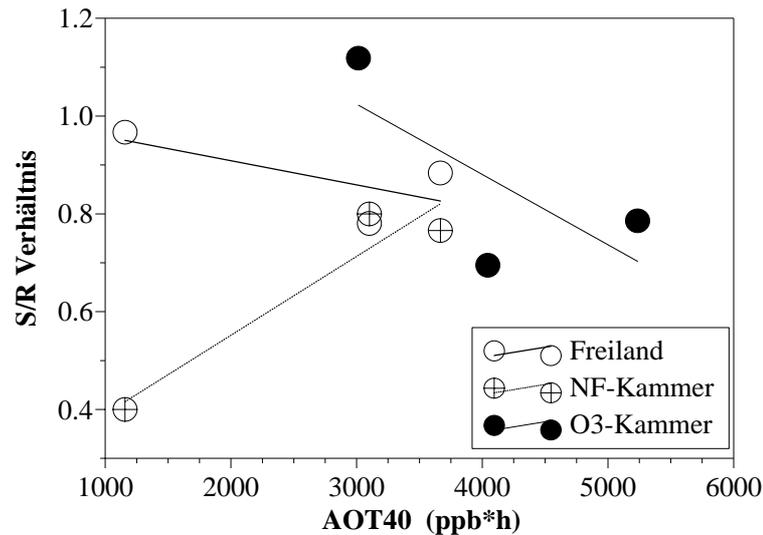


Abb. 23: Vergleich der NC-Sensitive / NC-Resistant Biomasseverhältnisse in Abhängigkeit vom AOT40-Index für das Jahr 1998 unter verschiedenen Expositionsbedingungen

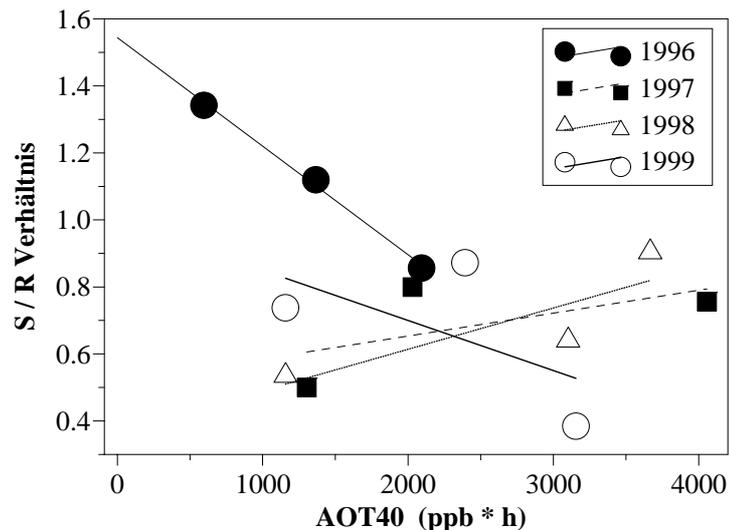


Abb. 24: NC-Sensitive / NC-Resistant Verhältnis der Blütenstandbiomasse in Abhängigkeit vom AOT40-Index für die Jahre 1996 bis 1999

Anders als alle anderen Pflanzenfraktionen sieht es bei der Anzahl der Blüten und deren Biomasse aus. Bei fast allen Expositionen in allen vier Jahren wies der resistente Klon eine höhere Anzahl von Blüten bzw. Blütenstandbiomasse auf. Der sensitive Klon zeigte eine 30 % bis 58,5 % Reduzierung der Anzahl der Blüten. Allerdings korrelierte diese Reduzierung nicht mit der herrschenden Ozonkonzentration, wie in Abbildung 24 zu sehen ist: Es gab sowohl aufsteigende als auch absteigende Tendenzen, wie es auch bei der Gesamtbiomasse der Fall war (vgl. Abb. 22).

Diese gegenläufige Befunde sind darauf zurückzuführen, dass der resistente Klon unter den vorherrschenden Witterungsbedingungen nicht optimal wuchs. Er ist Kälte und Nässe empfindlich.

3.4 Ableitung einer Fluss-Wirkung-Beziehung für das Auftreten erster sichtbarer Schadsymptome

Aufgrund der ungünstigen Wuchsbedingungen im Untersuchungszeitraum musste für den resistenten Klon auf eine Ableitung einer Fluss-Ertrag-Beziehung verzichtet werden. Nachstehend werden deshalb Untersuchungen beschrieben, die mit dem Ziel durchgeführt wurden, das erste Auftreten sichtbarer Schädigungen am O₃-sensitiven Kleeclon mit den absorbierten Schadstoffmengen zu korrelieren. Da die O₃-Aufnahme über die Stomata nicht direkt gemessen werden kann, muss sie mittels eines mikrometeorologischen Modells abgeschätzt werden.

3.4.1 Modellparametrisierung

Für die Parametrisierung des modifizierten *big-leaf* Modells PLATIN (PLant-ATmosphere INteraction; GRÜNHAGE & HAENEL, 1997) ist neben der Kenntnis des Zeitpunktes des Auftretens der ersten sichtbaren Schadsymptome am sensitiven Klon auch die Kenntnis

- der Entwicklung des Blattflächenindex (LAI) des sensitiven Kleeclones,
- der Entwicklung der Höhe des Kleebestandes (cm) und
- der Albedo der Kleegefäße und des verwendeten Substrates ("nackter" Boden)

erforderlich. Für die Modellparametrisierung ist zudem die Bestimmung der maximalen stomatären Leitfähigkeit (g_{\max}) (m/s) sowie die Kenntnis des stomatären Verhaltens des sensitiven Klonen in Abhängigkeit von der Strahlung, der Temperatur und des Wasserdampf-sättigungsdefizits der Atmosphäre erforderlich. Da die Modellvalidierung für den sensitiven Kleeclon über den Vergleich der gemessenen mit der simulierten Evapotranspirationsrate (siehe 3.4.1.6) erfolgt, ist auch die Erfassung des H₂O-Verbrauchs (ml) des sensitiven Kleeclones über einen bestimmten Zeitraum notwendig.

3.4.1.1 Entwicklung des *Leaf Area Index*

In Abb. 25 wird beispielhaft die LAI-Entwicklung (*Leaf Area Index*) für die dritte Expositionsperiode im dritten Jahr dargestellt.

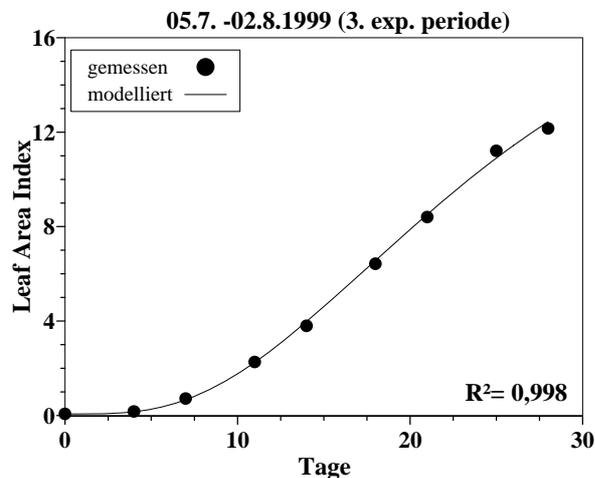


Abb. 25: Entwicklung des *Leaf Area Index* während der dritten Exposition des Jahres 1999

Die Beziehung zwischen LAI und der Anzahl der Expositionstage ergibt sich aus der folgenden Formel:

$$y = \alpha (1 - e^{-\lambda x})^{\kappa} \quad (19)$$

wobei:

$$y = \text{LAI},$$

$$x = \text{Tage}$$

$$\alpha, \lambda, \kappa = \text{berechnete Parameter}$$

Die Ergebnisse der anderen Expositionen finden sich im Anhang 3. Die vier Parameter, die die LAI-Entwicklung in den Jahren 1997, 1998 und 1999 beschreiben, sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Das sehr hohe R^2 zeigt, dass die Gleichung die gemessenen Daten gut beschreibt.

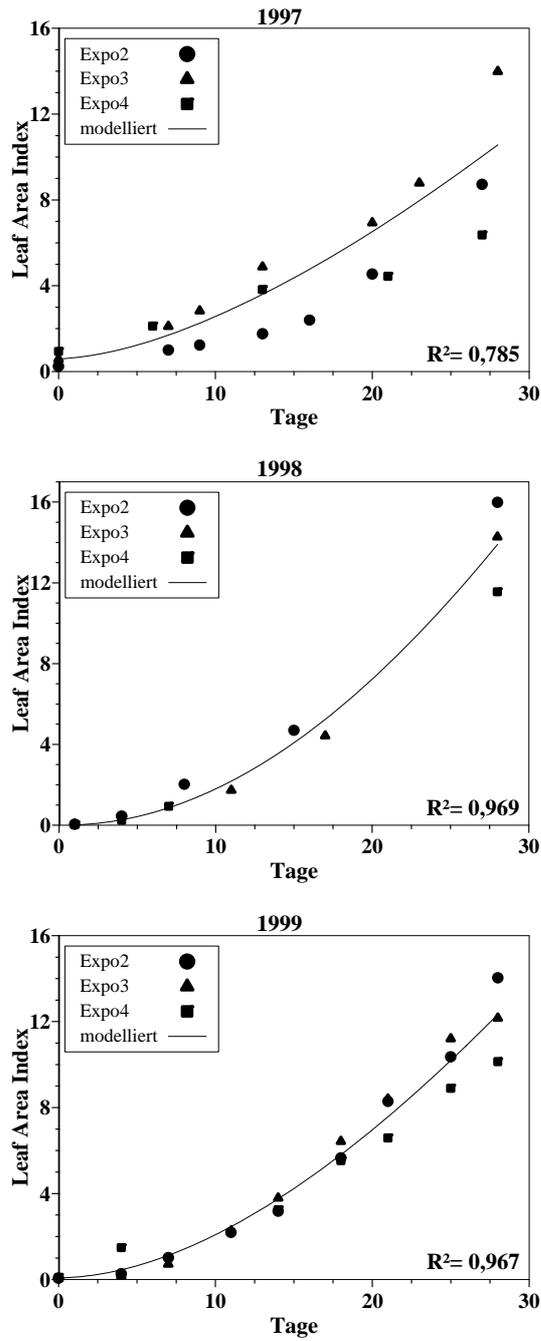
Allgemein unterschied sich der LAI der Pflanzen der ersten Exposition von denen der Expositionen 2, 3 und 4. Die letzteren Expositionen wiesen jeweils sehr ähnliche LAI-Werte in gleichen Zeitabständen und damit einen sehr ähnlichen Verlauf der LAI-Entwicklung auf. In der Abbildung 26 wird gezeigt, dass es für die Jahre 1997, 1998 und 1999 möglich ist, den LAI-Verlauf der Expositionen 2 bis 4 zusammenzufassen, mit einem jeweils guten Ergebnis. Beim Vergleich der Abbildungen im Anhang 3 fällt auf,

dass die erste Exposition in den Abbildungen 80 und 81 "flacher" verläuft. Die Pflanzen der jeweils ersten Exposition jedes Jahres haben bei Versuchsbeginn nur wenige Blätter, nehmen dann aber an Masse und Blattdeckung zu. Aus diesem Grund wurden, gemäß UN-ECE-Protokoll, für die Berechnung der LAI-Entwicklung die Werte der jeweils ersten Expositionen nicht berücksichtigt.

Tabelle 5: Koeffizienten zur Beschreibung der LAI-Entwicklung

<i>Expositionszeitraum</i>	<i>leaf area index</i>			
	<i>a</i>	λ	<i>k</i>	R^2
1997				
25.06. – 21.07.(2)	821,819	-0,00524	2,252	0,987
21.07. – 18.08.(3)	783,149	-0,00248	1,516	0,971
18.08. – 15.09.(4)	43,036	-0,00252	0,722	0,919
1998				
15.06. – 13.07.(2)	1593,610	-0,00339	1,919	0,998
13.07. – 10.08.(3)	2577,070	-0,00447	2,429	0,998
10.08. – 07.09.(4)	184,453	-0,01021	1,987	0,999
1999				
07.06. – 05.07.(2)	467,347	-0,00781	2,167	0,995
05.07. – 02.08.(3)	19,391	-0,08138	4,154	0,998
02.08. – 30.08.(4)	205,873	-0,00533	1,524	0,986

In der Abbildung 27 werden die Werte aller Expositionen der drei Jahre zusammengefasst. Wie ersichtlich wird ($R^2 = 0,908$), ist es möglich mit Hilfe dieser Beziehungen, zu jedem Zeitpunkt einer Exposition den aktuellen LAI-Wert zu ermitteln. Dieser ist für die Berechnung der Evapotranspiration und der PAD im Modell notwendig. Im Modell wurde für jede einzelne Exposition mit der dazugehörigen Beziehung gerechnet.



Jahr	leaf area index			
	A	λ	k	R ²
1997	251,438	0,005448	1,650	0,785
1998	472,168	-0,00755	2,126	0,969
1999	273,43	-0,00757	1,876	0,967

Abb. 26: Entwicklung des *Leaf Area Index* der letzten drei (2-4) Expositionen der Jahre 1997, 1998 und 1999

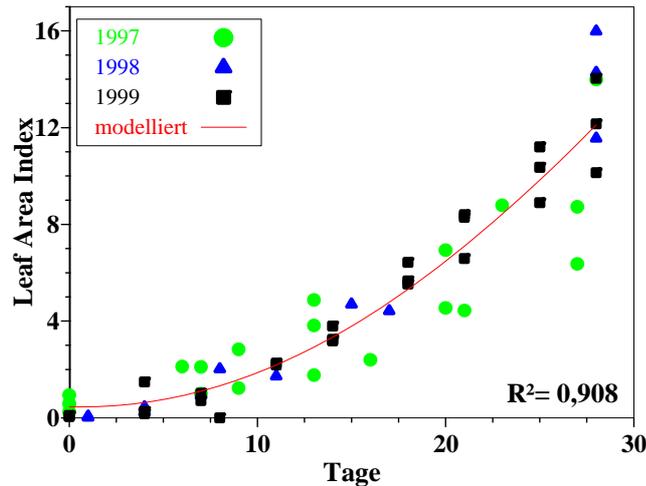


Abb. 27: Gemeinsame Entwicklung des *Leaf Area Index* der Expositionen 2-4 von drei Jahren (1997-1999)

3.4.1.2 Entwicklung der Bestandeshöhe

Die Entwicklung der Höhe des Kleebestandes bei allen Expositionen von 1997 bis 1999 wird in Abbildung 28 dargestellt.

Die zeitabhängige Entwicklung der Bestandeshöhe wird durch Gleichung 20 beschrieben:

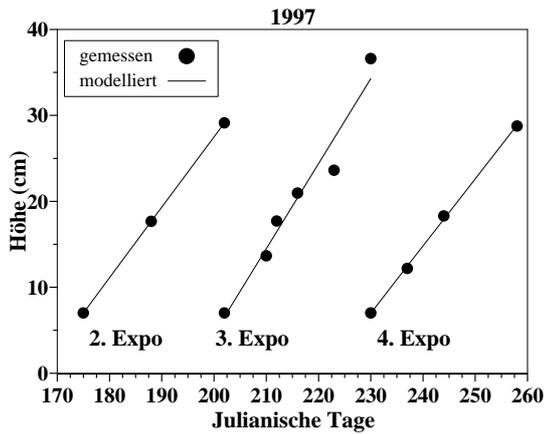
$$y = y_0 + ax \quad (20)$$

wobei: y = Höhe
 y_0 = Höhe am Tag des Expositionsbeginns
 x = Tage seit Expositionsbeginn

In Abbildung 29 wurden die Expositionen 2, 3 und 4 von allen drei Jahren zusammengefasst und in einem gemeinsamen Modell dargestellt.

3.4.1.3 Albedo

Die Albedo wurde an 6 verschiedenen Tagen bestimmt (Tabelle 6). Jeder aufgeführter Wert ist das Mittel von sechs Einzelwerten. Für die Modellierungen wurde für den S-Klon eine Albedo von 0,324 und für das Substrat 0,19 verwendet.



Berechnete Parameter:

1997

2. Exposition:

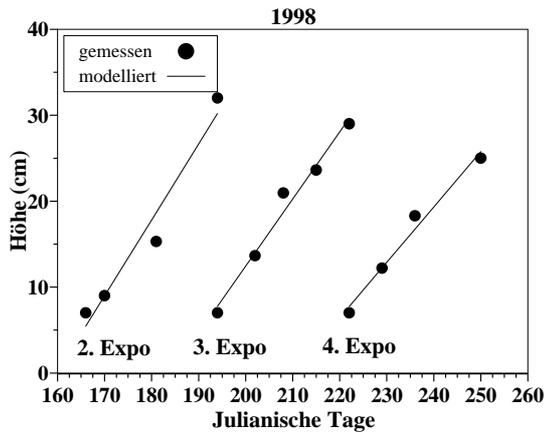
$$y_0=7,002 \quad \alpha=0,820 \quad R^2=0,999$$

3. Exposition:

$$y_0=6,552 \quad \alpha=0,990 \quad R^2=0,956$$

4. Exposition:

$$y_0=6,986 \quad \alpha=0,781 \quad R^2=0,999$$



1998

2. Exposition:

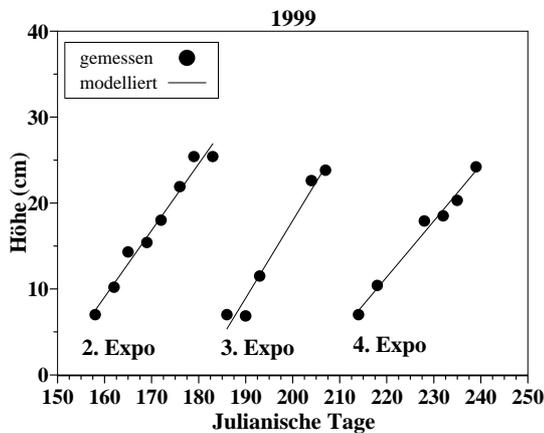
$$y_0=5,443 \quad \alpha=0,884 \quad R^2=0,955$$

3. Exposition:

$$y_0=7,751 \quad \alpha=0,781 \quad R^2=0,978$$

4. Exposition:

$$y_0=7,740 \quad \alpha=0,644 \quad R^2=0,980$$



1999

2. Exposition:

$$y_0=7,504 \quad \alpha=0,776 \quad R^2=0,976$$

3. Exposition:

$$y_0=5,350 \quad \alpha=0,900 \quad R^2=0,969$$

4. Exposition:

$$y_0=7,943 \quad \alpha=0,504 \quad R^2=0,830$$

Abb. 28: Entwicklung der Höhe des Kleebestandes bei allen Expositionen von 1997 bis 1999

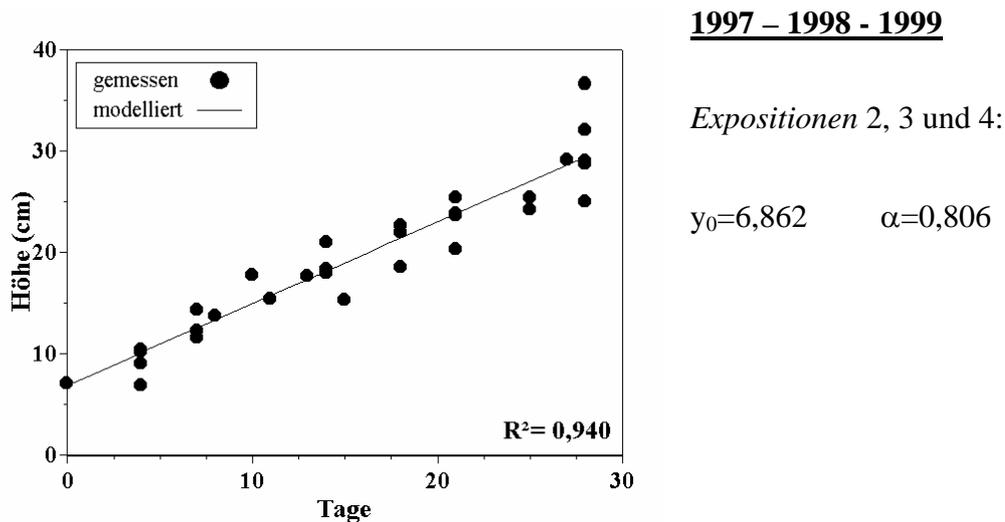


Abb. 29: Mittlere Entwicklung der Höhe des Kleebestandes für alle Expositionen und Jahre (1997 bis 1999)

Tabelle 6: Albedomittelwerte für den S-Klon und das Kultursubstrat

S-Klon	Unbewachsener Boden
0,29	0,19
0,322	0,19
0,317	0,22
0,373	0,21
0,34	0,18
0,309	0,17
Mittelwert=0,324	Mittelwert=0,19

3.4.1.4 Stomataverhalten

Die Porometermessungen fanden im Jahr 1997 am Blatt Nr. 3, 4 und 5 und im Jahr 1998 am Blatt Nr. 3 (das jüngste vollentwickelte Blatt) statt. Mit den Porometerdaten wurde eine *boundary-line analysis* durchgeführt. Hierbei nimmt man an, dass die größeren Werte, die einzigen Werte sind, die keine Limitation von anderen Faktoren aufweisen. Alle anderen Daten, die sich unterhalb dieser definierten Linie befinden, werden von verschiedenen Faktoren wie z.B. Strahlung, Temperatur und Luftfeuchtigkeit limitiert. Es ist sehr wichtig, die "richtige" g_{max} zu wählen, denn alle Daten werden durch diesen Wert dividiert. Um den richtigen g_{max} zu ermitteln, muss man bei einem niedrigen Wasserdampf-sättigungsdefizit der Atmosphäre (VPD; *vapour pressure deficit*) messen. Neben einer hohen Luftfeuchtigkeit muss gleichzeitig eine hohe Einstrahlung

gegeben sein. Diese Konstellation ist im Freiland selten anzutreffen. Wenn man das Blatt in der Kammer einspannt, wird es, auch wenn die relative Feuchtigkeit hoch ist, bei einer hohen Einstrahlung schnell trocken, weil man die Feuchte nur bedingt konstant halten kann. So gibt es eine Reihe von Ausreißern in der Graphik der Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Strahlung (Abb. 30), was das Ergebnis fluktuierender Bedingungen sein kann: Wenn einmal die Sonne scheint und dann eine Wolke kommt, können die Stomata nicht so schnell reagieren und man bekommt als Ergebnis, dass auch bei niedriger Einstrahlung die Stomata ganz weit offen sind, was nicht zutrifft. Diese Daten wurden nicht berücksichtigt. Beim Klee konnte zudem nicht immer das gleiche Blattalter erfasst werden; jüngere Blätter reagieren viel später auf ein ansteigendes VPD als ältere. Es wurde somit beschlossen, den höchsten gemessenen stomatären Leitwert als g_{\max} zu definieren; auf eventuelle Unsicherheiten bezüglich dieser Wahl wird eingegangen.

Im PLATIN wird die Abhängigkeit der Öffnungsweite der Stomata von der Strahlung, der Lufttemperatur und dem VPD mittels der sogenannten Jarvis-Stewart-Funktionen beschrieben (JARVIS, 1976; STEWART, 1988).

$$\frac{1}{R_{stom, H_2O}} = \frac{1}{R_{stom, H_2O, \min}} \cdot f_1(S_t) \cdot f_2(T(z_m)) \cdot f_3(VPD(z_m)) \quad (21)$$

wobei $R_{stom, H_2O, \min}$ den minimalen stomatären Bestandeswiderstand für Wasserdampf eines vollentwickelten Bestandes (ohne senescente Blätter) unter optimalen Bedingungen für maximale Transpiration, beschreibt. Die Funktionen $f_1(S_t)$, $f_2(T)$, $f_3(VPD)$ beschreiben die Effekte der Strahlung, Temperatur, VPD auf die stomatäre Öffnungsweite ($0 \leq f_i \leq 1$).

Für die Jarvis-Faktoren können alternative Funktionen im PLATIN verwandt werden. Die folgende Beziehung beschreibt die Abhängigkeit der stomatären Öffnungsweite von der Strahlung, wie sie von DOLMAN (1993) beschrieben wurde:

$$\text{TYP_F1} = 1: \quad f_1(S_t) = \frac{S_t}{S_1} \left(\frac{S_1 + S_2}{S_t + S_2} \right) \quad (22)$$

mit S_t aktuelle Globalstrahlung ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$)
 S_1 und S_2 Koeffizienten ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$) wobei S_1 die maximale Globalstrahlung

Die Abhängigkeit von der Temperatur wird mit der Funktion von HICKS et al. (1987) beschrieben:

$$\text{TYP_F2=1: } f_2(T) = \left(\frac{T - T_1}{T_2 - T_1} \right) \left(\frac{T_3 - T}{T_3 - T_2} \right)^{\frac{T_3 - T_2}{T_2 - T_1}} \quad (23)$$

mit T aktuelle Temperatur (°C)
 T_1 Minimal-Temperatur (°C)
 T_2 Optimum-Temperatur (°C)
 T_3 Maximal-Temperatur (°C)

Für den Wasserhaushalt der Pflanzen ist vor allem das VPD der Luft von großer Bedeutung, da es direkt die Evaporation und die Transpiration beeinflusst. Die Abhängigkeit der stomatären Öffnungsweite von dem VPD wird mit Hilfe folgender Formel beschrieben:

$$\text{TYP_F3=3: } f_3(\text{VPD}) = \frac{\text{VPD} - V_1}{V_2 - V_1} \quad (\#) \quad (24)$$

mit

$$f_3(\text{VPD}) = 1 \quad \text{für } \text{VPD} < V_2$$

$$f_3(\text{VPD}) = V_3 \quad \text{für } f_3(\text{VPD}) < V_3$$

und

VPD aktuelles Wasserdampfsättigungsdefizit der Atmosphäre (hPa)
 V_1 Maximalwert für VPD (hPa)
 V_2 Schwellenwert für VPD (hPa)
 V_3 Schwellenwert für die Kontrollfunktion ($F3 = V_3$)

(#) Die Funktion berücksichtigt, dass der Einfluss des VPD auf das Öffnungsverhalten der Stomata erst ab einem bestimmten Schwellenwert V_2 wirksam wird.

Folgende Koeffizienten der Kontrollfunktionen des Jarvis-Stewart-Modells wurden im PLATIN für den Klee eingesetzt: Für die **Strahlung** wurde als S_1 1000 ($\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$) und als S_2 120 ($\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$) eingesetzt. Für die **Temperatur** wurde als T_1 (Minimal-Temperatur) 5 (°C), als T_2 (Optimum-Temperatur) 25 (°C) und als T_3 (Maximal-Temperatur) 40 (°C) eingesetzt. Für das **VPD** wurde als V_1 (Maximalwert für VPD) 45 (hPa), für V_2 (Schwellenwert für VPD) 10 (hPa) und für V_3 (Schwellenwert für die Kontrollfunktion ($F3 = V_3$)) 0,2 eingesetzt.

In Abbildungen 30-32 ist die Abhängigkeit der stomatären Leitfähigkeit von Strahlung, Lufttemperatur und Wasserdampfsättigungsdefizit der Atmosphäre dargestellt. Die schwarzen Punkte stellen die gemessenen Daten dar. Die rote Linie wird mit Hilfe der Jarvis-Stewart-Funktionen errechnet.

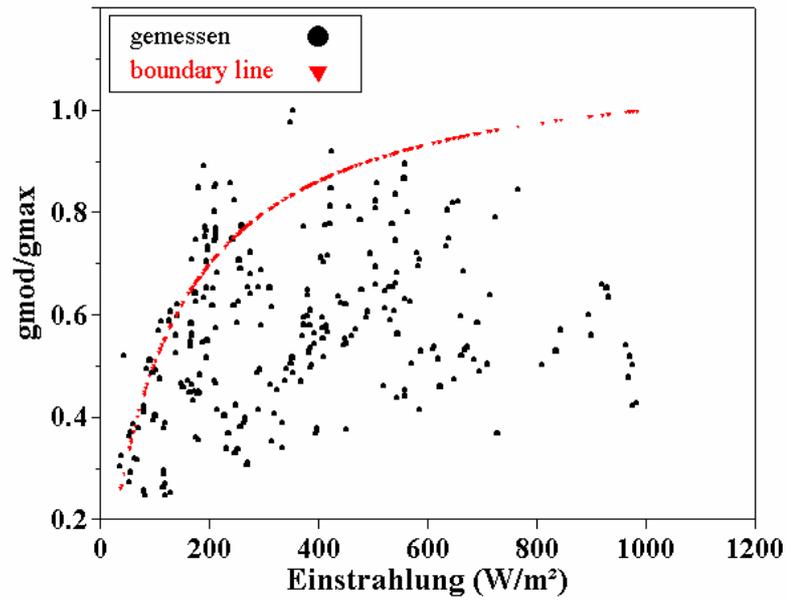


Abb. 30: Abhängigkeit der stomatären Leitfähigkeit (g_{stom}) von der Strahlung

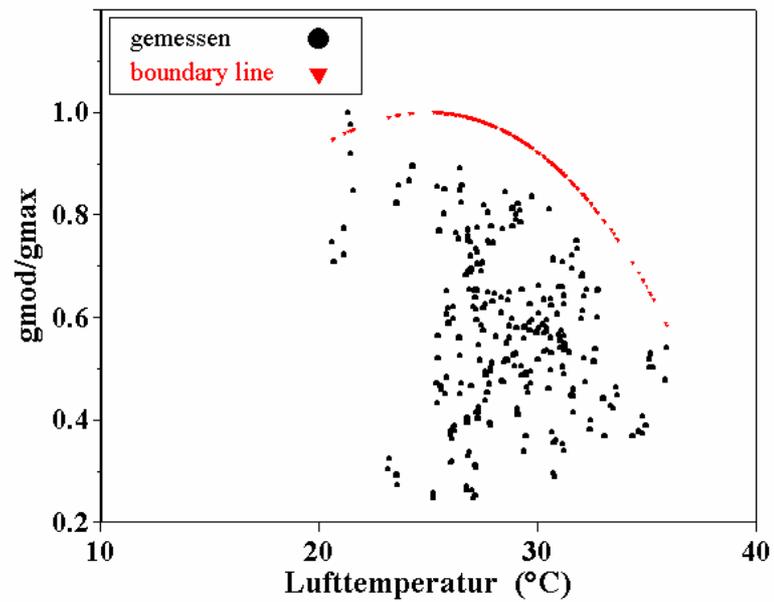


Abb. 31: Abhängigkeit der stomatären Leitfähigkeit (g_{stom}) von der Lufttemperatur

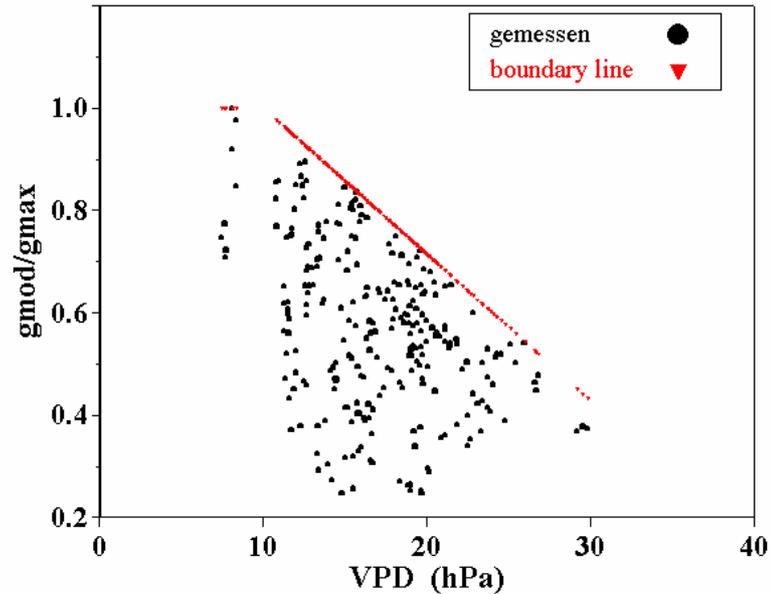


Abb. 32: Abhängigkeit der stomatären Leitfähigkeit (g_{stom}) vom Wasserdampf-sättigungsdefizit der Atmosphäre (*vapor pressure deficit*; VPD)

In Abbildung 33 sind die gemessenen Werte der Leitfähigkeit gegen die modellierten aufgetragen. Es wird ersichtlich, dass mit Hilfe des Modells das stomatäre Verhalten der Kleepflanzen mit einem R^2 von 0,464 interpretiert werden kann.

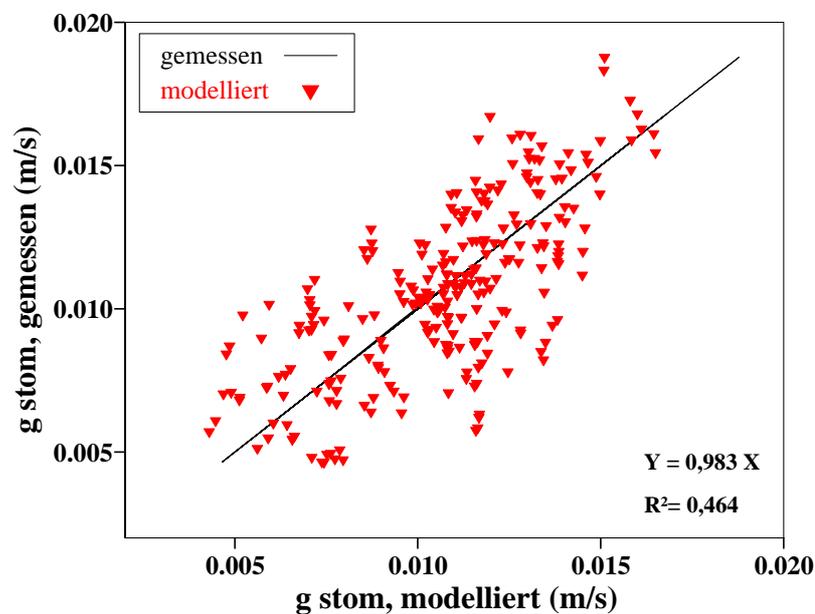


Abb. 33: Verhältnis der gemessenen zur modellierten stomatären Leitfähigkeit (g_{stom})

Mit Hilfe der gemessenen Porometerdaten ($n = 261$) wurde eine maximale stomatäre Leitfähigkeit g_{max} von $0,01878 \text{ m/s}$ ($= 765 \text{ mmol/m}^2\text{s}$) ermittelt, welches einem minimalen Blattwiderstand ($R_{\text{min,leaf}}$) von $53,2 \text{ s/m}$ entspricht. Dieser Wert entspricht bei

einem LAI von $6,5 \text{ m}^2/\text{m}^2$ einem minimalen Bestandswiderstand $R_{c, \text{stom}, \text{H}_2\text{O}, \text{min}}$ von $8,2 \text{ s/m}$ (Gleichung 25).

$$R_{c, \text{stom}, \text{H}_2\text{O}} = \frac{R_{\text{stom}, \text{leaf}, \text{H}_2\text{O}}}{LAI} \quad (25)$$

Der minimale Bestandswiderstand für Ozon $R_{c, \text{stom}, \text{O}_3}$ wird mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$R_{c, \text{stom}, \text{O}_3} = R_{c, \text{stom}, \text{H}_2\text{O}} \cdot \frac{D_{\text{H}_2\text{O}}}{D_{\text{O}_3}} \quad (26)$$

wobei $D_{\text{H}_2\text{O}}$ und D_{O_3} die molekularen Diffusivitäten (Diffusionskonstanten) für Wasserdampf und Ozon darstellen.

3.4.1.5 Evaporation von unbewachsenen Boden

In den folgenden Abbildungen wird die Evaporation des unbewachsenen Bodens dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die gute Anpassung der gemessenen an die modellierten Daten. In der Abbildung 34 und 35 sind alle Daten von 1997 und 1998, die die Voraussetzungen für das Modell erfüllten, aufgenommen. An diese Daten wurde der Bodenwiderstand " R_{soil} " angepasst und mit den Daten von 1999 validiert.

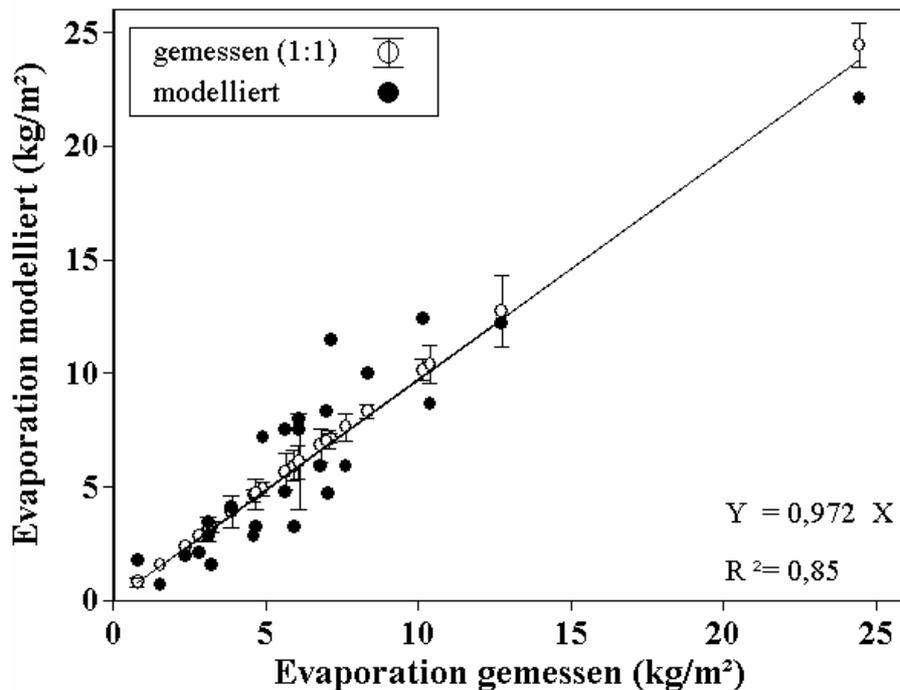


Abb. 34: Gemessene und modellierte Evaporationsdaten des unbewachsenen Bodens für die Jahre 1997 und 1998

Folgende *Voraussetzungen* müssen für die Validierung des Modell erfüllt sein:

1. Der Gefäßrand muss immer an der Oberfläche des Bestandes sein (1999 war der Bestand höher als in den anderen Jahren, darum konnten diese Daten bei einem hohen Umgebungs-LAI nicht verwendet werden).
2. Es muss sich um eine "trockene" Periode handeln. Die Daten der Tage, an denen es sehr viel geregnet hat, sind nicht berücksichtigt worden. Das Gefäß hat ein Überlaufloch durch das bei regnerischen Tagen eine unbekannte Menge Wasser austreten konnte (Schwellenwert = 4,4 mm/Tag).

Man sieht, dass bei einigen Terminen die Evaporation unterschätzt oder überschätzt wurde. Das hing jeweils von den Witterungsbedingungen ab, die einige Tage vor den Messungen herrschten. Im Jahr 1997 hat es weniger geregnet und die Gefäße liefen nicht über; die modellierten Werte sind in diesem Jahr größer. Im Jahr 1998 liefen sehr viele Gefäße über; hier sind die entsprechenden modellierten Werte kleiner. Am 10. Messpunkt der Abb. 35 (mit Pfeile gekennzeichnet) hatte es am Tag davor einen starken Niederschlag gegeben. Das kann bedeuten, dass der Boden schon sehr nass war, und deshalb der Wasserverbrauch geringer ausfiel als modelliert wurde. Generell konnten die modellierten Daten relativ gut an die gemessenen angepasst werden.

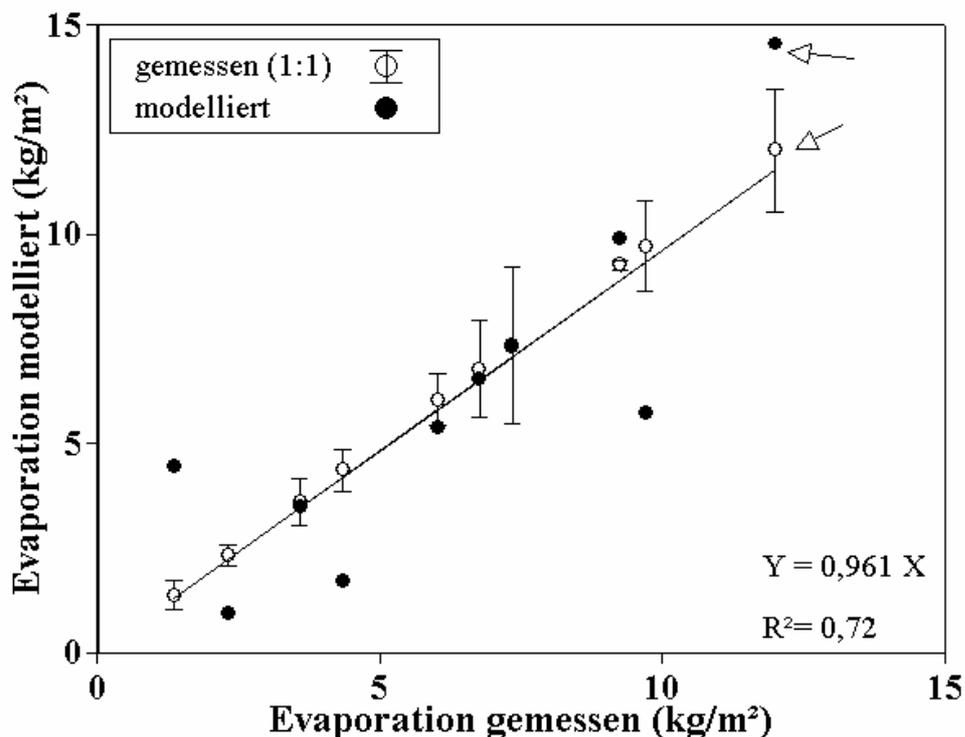


Abb. 35: Gemessene und modellierte Evaporationsdaten des unbewachsenen Bodens für das Jahr 1999

3.4.1.6 Evapotranspiration

In den folgenden Graphiken werden die modellierten Evapotranspirationsraten der Pflanzen (sensitiver Klon) vorgestellt. Anhand der Porometerdaten und den daraus resultierenden Jarvis-Faktoren, wird die Verdunstung der Pflanzen modelliert.

Daraus kann mit Hilfe der gemessenen und modellierten Evapotranspirationsraten unter Berücksichtigung des Oasen-Effektes der minimale stomatäre Bestandeswiderstand zusätzlich berechnet werden. Das Modell wurde mit den Daten von 1997 und 1998 angepasst, die Jarvis-Faktoren wurden ermittelt und das Modell mit den Daten von 1999 verifiziert. Die Anpassung führte zu einem $R_{c, \text{stom}, \text{H}_2\text{O}, \text{min}}$ von 7,5 s/m was in sehr guter Übereinstimmung mit dem aus den Porometerdaten abgeleiteten Wert ($R_{c, \text{stom}, \text{H}_2\text{O}, \text{min}}$ von 8,2 s/m) steht. Das ganze kann als eine unabhängige Validierung gesehen werden. Die Jarvis-Faktoren, die eingesetzt wurden, sind dem Abschnitt 3.4.1.4 zu entnehmen.

Für die Modellierung wurden nur die Evapotranspirationsdaten bis zu einem LAI von 6,5 berücksichtigt: Oberhalb eines LAI von 6,5 ragen die Blätter der Klee-Pflanze aus dem Gefäß. Somit ist die Fläche des Gefäßes viel kleiner, als die der oberirdischen Vegetation, was mit der Simulation eines Feldes nicht übereinstimmt. Außerdem fällt bei einem vollständigen Blätterdach der Regen nicht mehr direkt auf den Boden, sondern von den Blättern herab. Das ganze würde also nicht in Übereinstimmung mit dem *big-leaf* Konzept stehen.

Die Berechnung der Evapotranspirationsdaten des "Kleegefäßes" ist komplizierter als die des unbewachsenen Bodens. Dennoch wird der $R_{\text{boden}, \text{Widerstand}}$ auf $R_{\text{boden}, \text{min}}$ gesetzt und es wird angenommen, dass keine Austrocknung der Bodenoberfläche stattfindet, da Feldkapazität herrscht. Wichtige Funktionen sind der $R_{\text{min}, \text{vegetation}}$, die Jarvis-Faktoren und das c_{LAI} . Das c_{LAI} ist ein Lichtdämpfungskoeffizient, der speziell für jeden Vegetationstyp anzupassen ist. Bei Gräsern würde er 0,3 betragen, da diese mehr senkrecht stehen. In unserem Fall wird das c_{LAI} konstant bei 1,8 gehalten, da der Kleebestand ein horizontales Blätterdach bildet. Zu Beginn des Versuches, wenn der Kleebestand kurz ist, stehen auch die Klee-Pflanzen senkrecht (wie Gras); erst später bildet sich das Blätterdach. Das gleiche gilt auch für den R_{boden} . Am Anfang, wenn die Pflanzen ein erstes Mal geerntet wurden, kann die Bodenoberfläche austrocknen, später, wenn sich die ersten Blätter entwickelt haben und ein kleines Blätterdach entstanden ist, ist der Boden sehr feucht. Dieser Zeitraum ist relativ kurz, denn nach der ersten Ernte (die ja nicht berücksichtigt wird) bildet sich das neue Blätterdach relativ schnell. Folgende *Voraussetzungen* müssten die Evapotranspirationsdaten erfüllen, um in die Auswertung aufgenommen zu werden:

1. Alle Termine, bei denen das Wasser übergelaufen ist, werden herausgenommen.
2. Daten bis zu einem Niederschlag von 4,4 mm werden berücksichtigt und als "trocken" bezeichnet (siehe unten).
3. Werte vom Kleebestand in den Gefäßen über einem LAI von 6 werden nicht berücksichtigt (siehe oben).
4. Die Kleegefäße müssen während der ganzen Expositionsdauer in der gleichen Höhe sein, in der sich die Vegetation des umliegenden Feldes befindet.

Einzelne Termine, bei denen Regen gefallen ist, konnten berücksichtigt werden, wenn gewährleistet wurde, dass der gemessene Niederschlag über mehrere Tage der laufenden Messung stattfand, und nicht nur an einem einzelnen Tag oder sogar innerhalb weniger Stunden gefallen ist. Im Falle eines starken Regens, kann das Wasser bereits bei einem LAI von 3, der ein relativ vollständiges Blätterdach kennzeichnet, den Boden nicht direkt treffen und läuft über die Blätter nach unten oder läuft aus dem Überlaufloch heraus. Außerdem muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass in PLATIN das Wasser, was sich an der Oberfläche der Blätter befindet, berücksichtigt wird.

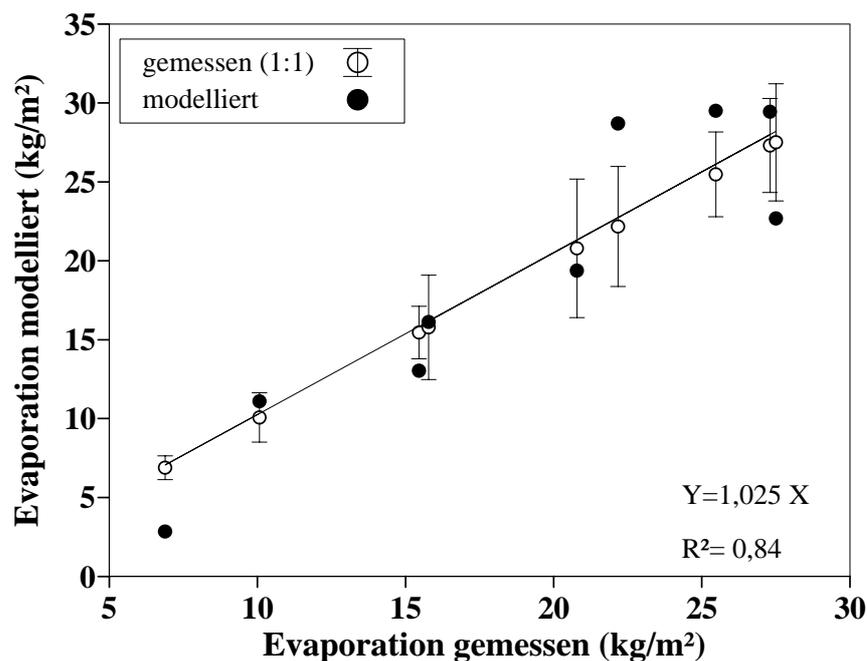


Abb. 36: Gemessene und modellierte Evapotranspirationsdaten der Klee-Gefäße für das Jahr 1997

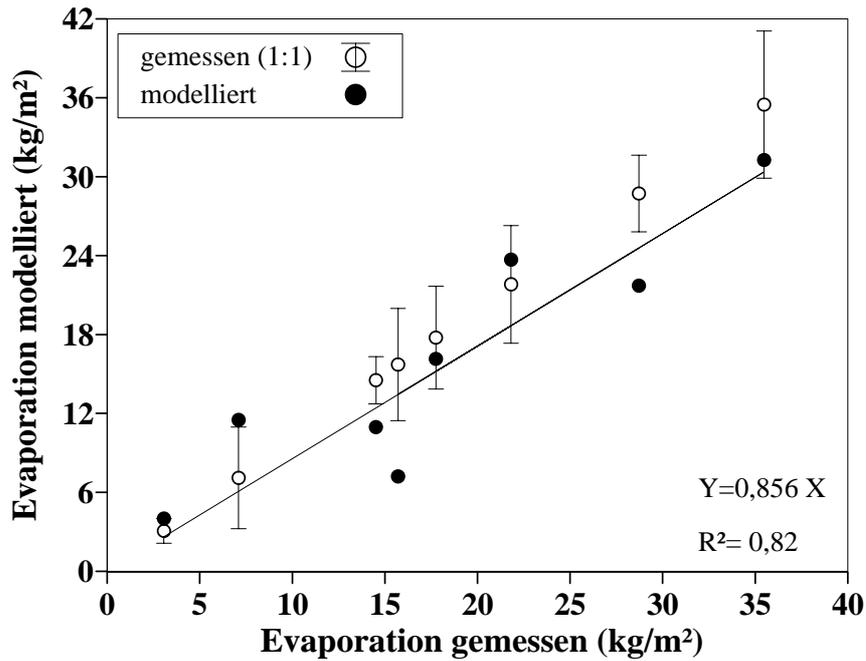


Abb. 37: Gemessene und modellierte Evapotranspirationsdaten der Klee-Gefäße für das Jahr 1998

In den Abbildungen 36 bis 37 wird die modellierte Evapotranspirationsrate für die Jahre 1997 bis 1999 gezeigt. Es wird erkennbar, dass für alle drei Jahre die gemessenen Daten sehr gut den modellierten angepasst werden konnten mit einem relativ guten R^2 . Damit ist es möglich, das Modell zu benutzen und die absorbierte Dosis zu ermitteln.

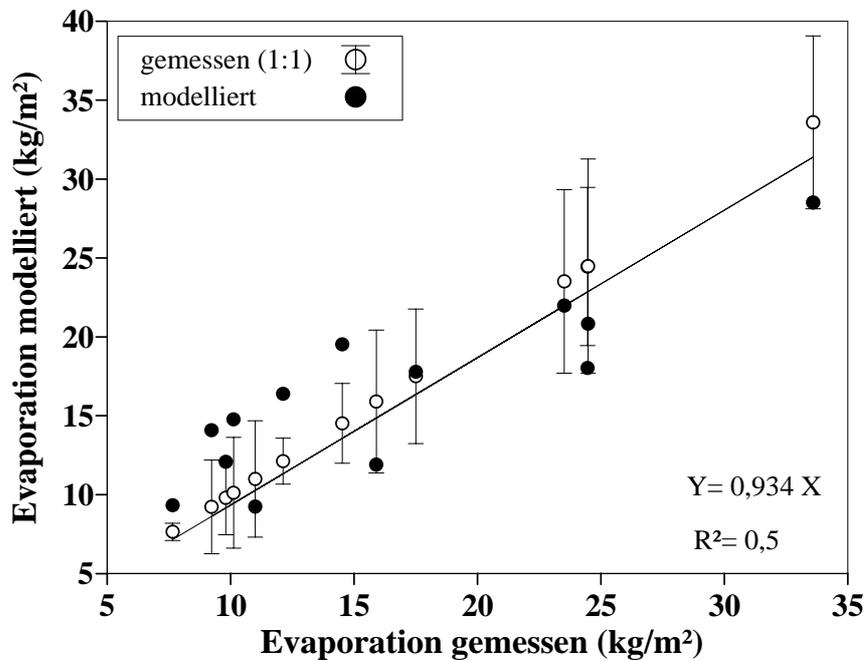


Abb. 38: Gemessene und modellierte Evapotranspirationsdaten der Klee-Gefäße für das Jahr 1999

3.4.2 Berechnung der *pollutant-absorbed-dose* (PAD)

In den nächsten vier Abbildungen (Abb. 39-42) wird die PAD für alle beobachteten Jahre vorgestellt. Um mögliche O₃-Schädigungen zu erfassen, wurde jeden 3. oder 4. Tag bonitiert; das sind n = 89 in vier Expositionsjahren. Davon zeigten sich bei n = 29 Bonituren Schäden bzw. zusätzliche neue Schadsymptome. Bei jeder Exposition wird jeweils am Anfang der Tag markiert, an dem der Schaden zum ersten Mal auftritt und danach wird nur der Tag angezeigt, wo ein zusätzlicher Schaden aufgetreten ist.

Die stomatare Aufnahme PAD(O₃) wurde über 5 aufeinanderfolgende Tage aufsummiert. In diesen Zeitraum hat die Pflanze die Möglichkeit zu reagieren. Die Feldbeobachtungen zeigten, dass die Pflanzen nicht immer direkt nach einer Spritzenkonzentration reagierten, sondern teilweise erst nach einigen Tagen. Also spielt die Summe der Ozonbelastung einiger Tage eine Rolle. In den Graphiken 39 bis 42 ist eine Linie eingezeichnet, die einem PAD-Wert von 300 ± 30 mg O₃/m² Grundfläche in 5 aufeinanderfolgenden Tagen entspricht. Unterhalb dieser Linie ist kein Schaden aufgetreten.

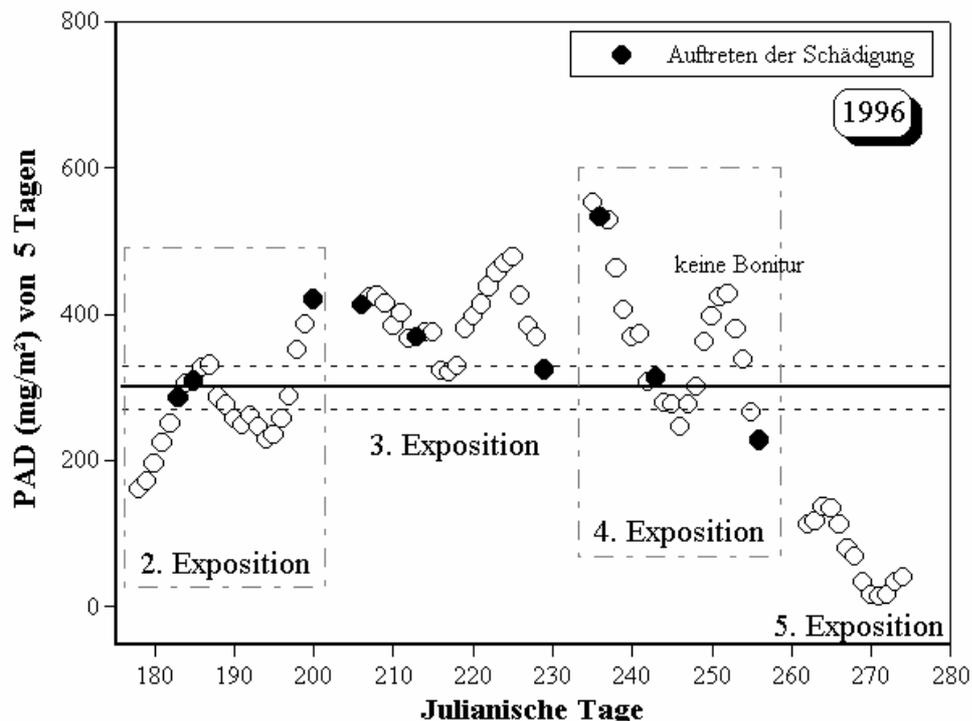


Abb. 39: Simulierte PAD für alle Expositionen des Jahres 1996

In der Abbildung 39 wird die berechnete PAD für alle Expositionen des Jahres 1996 gezeigt - mit Ausnahme der ersten Exposition. Es wird deutlich, dass bei allen Expositionen die Schädigung erst nach einiger Zeit eintritt. Über einem bestimmten Grenzwert der PAD Aufnahme tritt jeweils ein Schaden auf, wobei systematisch am Ende einer

Exposition auch immer ein zusätzlicher Schaden zu verzeichnen ist. Auch bei der 4. Exposition könnte man diesen zusätzlichen Schaden erwarten, doch aufgrund fehlender Bonitierung zu diesem Zeitraum lässt sich hierzu keine definitive Aussage machen. Es könnte also sein, dass der Schaden der bei der Ernte beobachtet wurde, von diesem Spitzenwert hervorgerufen wurde. Das ist der Grund warum der letzte Schaden unterhalb des Grenzwertes liegt. Auch in den nächsten 3 Jahren tritt unterhalb dieses Grenzwertes kein Schaden auf. Im Jahr 1996 wurde auch eine 5. Exposition durchgeführt. Diese war allerdings im Oktober und zeigte, wie erwartet, keine Schäden.

Für das folgende Jahr zeichnet sich der gleiche Verlauf ab. Bei der Überschreitung einer akkumulierten O₃-Dosis von 300 mg /m² ist immer ein Schaden zu sehen. Bei der 3. Exposition des Jahres 1997 hätte man Schäden erwartet, welche aber nicht eingetreten sind. Ebenso bei der 3. Exposition des Jahres 1998. Hier hätte man Schäden ein paar Tagen früher erwarten können, entsprechend der letzten Exposition des gleichen Jahres. Für das Jahr 1999 ist auffallend, dass nicht viele Werte unterhalb des Grenzwertes liegen und das höhere PAD-Werte auftreten.

Das Ozon hat nicht nur eine direkte Wirkung auf den Pflanzenorganismus, sondern auch indirekte Wirkungen. Es werden ozoninduzierte Veränderungen der Empfindlichkeit der Pflanzen gegenüber abiotischen, wie u.a. Frost (SKÄRBY et al., 1998) oder biotischen Stressfaktoren, wie u.a. Pilze, Viren (RIEMER & WHITTAKER, 1989; MANNING & VON TIEDEMANN, 1995) beobachtet. Das Ausmaß der Schädigung ist unter dem Einfluss von Ozon erheblich größer.

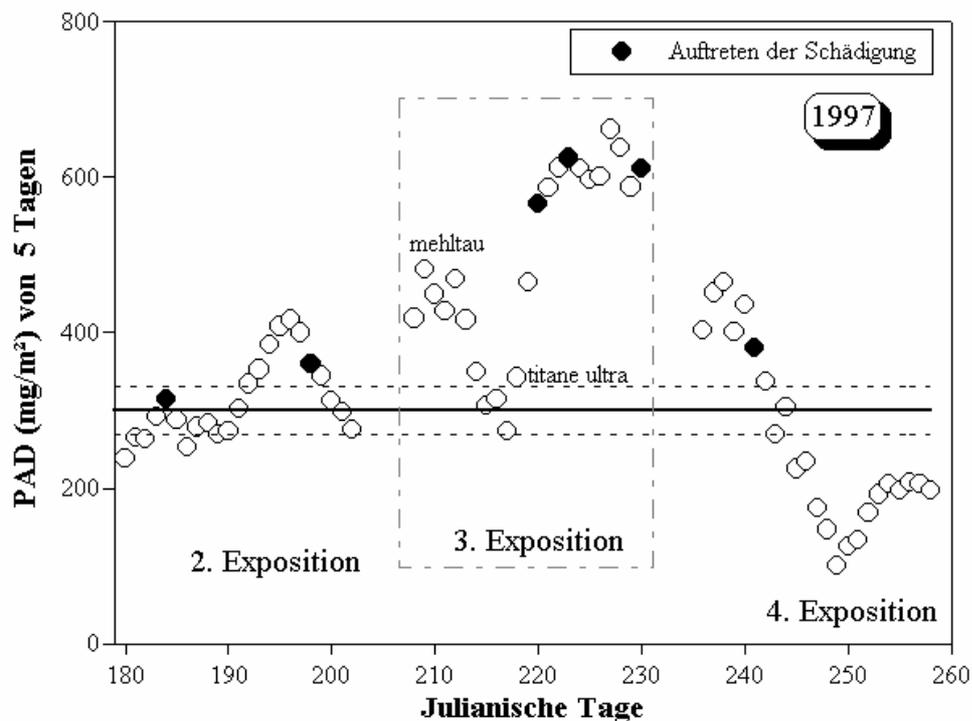


Abb. 40: Simulierte PAD für alle Expositionen des Jahres 1997

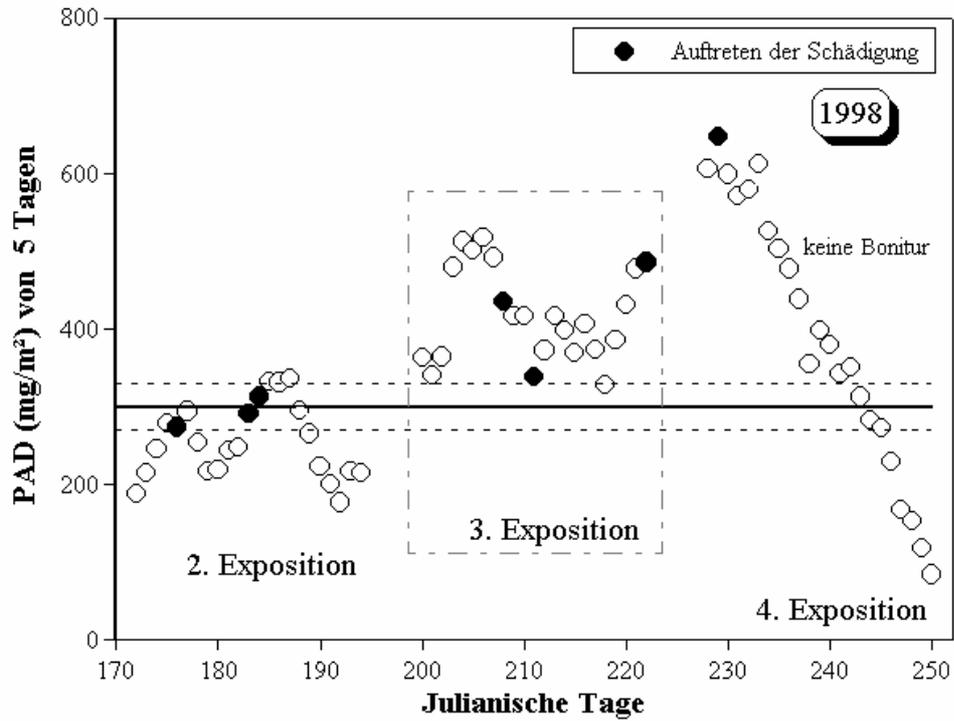


Abb. 41: Simulierte PAD für alle Expositionen des Jahres 1998

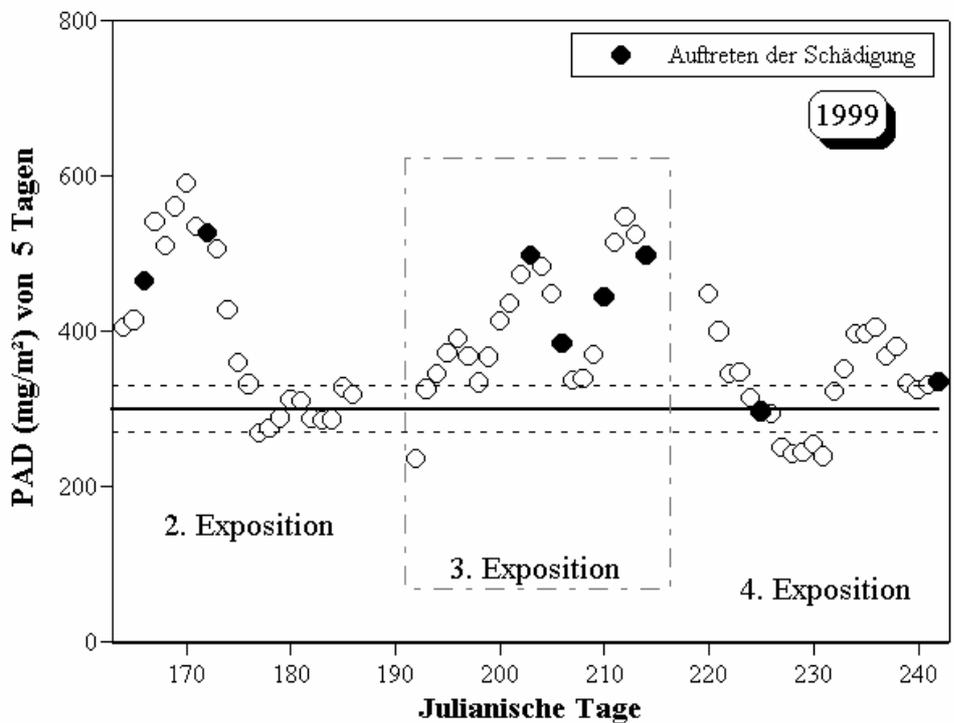


Abb. 42: Simulierte PAD für alle Expositionen des Jahres 1999

In der dritten Exposition des Jahres 1997 wurden die Pflanzen von Mehltau befallen, aber es war keine Schädigung erkennbar. MANNING & VON TIEDEMANN (1995) zeigten,

dass die Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber bestimmten Pilzkrankheiten unter Ozonbelastung zunimmt. Ob dies auch für die Kleepflanzen zu trifft, kann an dieser Stelle nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, die Möglichkeit sollte jedoch in Betracht gezogen werden.

3.4.3 Gegenüberstellung von PAD- und AOT40-Werten

In Abbildung 43 wird das Verhältnis der AOT40-Werte zu den PAD-Werte jeweils akkumuliert über 5 Tage für alle Zeiträume dargestellt, in denen Schadsymptome beobachtet wurden.

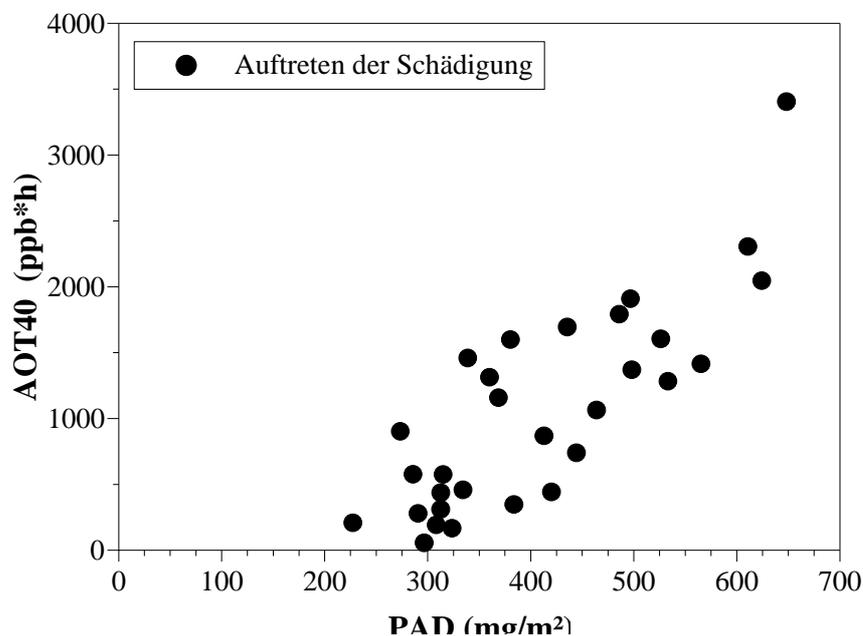


Abb. 43: Verhältnis der AOT40 Werte zu den PAD Werten für alle Expositionsjahre

Es wird ersichtlich, dass ein enger Zusammenhang zwischen PAD und AOT40 nicht gegeben ist. Da der AOT40-Expositionsindex mit den Konzentrationen an der oberen Grenzfläche der quasi-laminaren Schicht berechnet wurde, ist dieser Befund leicht erklärbar: Unter den die O_3 -Aufnahme limitierenden Bedingungen, können sich O_3 Konzentrationen an der quasi-laminaren Schicht einstellen, die toxikologisch nicht relevant sind. Eine Zusammenstellung der einzelnen Ergebnissen findet sich in Anhang 4.

3.5 Untersuchungen zu den Ursachen der unterschiedlichen O₃-Empfindlichkeit der Kleeklone

Da die stomatären Widerstände beider Klone keine nennenswerten Unterschiede aufwiesen (Ergebnisse werden nicht gezeigt), muss die unterschiedliche Sensitivität im Stoffwechsel und / oder der Blattanatomie begründet sein.

3.5.1. Stoffwechselfparameter

3.5.1.1 Gesamtblatt

Ascorbinsäure

Die Gesamtascorbatmengen (G-AsA) lagen um 2 mg/g FG. Hinsichtlich der Ascorbatmengen sind zwischen den Klonen keine großen Unterschiede zu verzeichnen (Abb. 44). Im Laufe der Expositionen vermindert sich die Gesamtmenge des Ascorbats. Der zeitliche Verlauf zeigt Schwankungen. Prinzipiell gilt, dass der mit Ozon behandelte Klon fast immer eine höhere Ascorbatkonzentration aufweist. Gleiche Tendenzen zeichneten sich auch bei den restlichen Expositionen ab, obwohl keine großen Unterschiede auftraten.

In Abbildung 45 wird die Menge des reduzierten Ascorbats (AsA) für alle Expositionen der Jahre 1998 und 1999 dargestellt. Es sind zwischen den Kontrollen und den ozonbehandelten Pflanzen keine eindeutigen Veränderungen zu erkennen. Die Menge des reduzierten Ascorbats variierte von ca. 0,7 bis 1,8 mg/g FG. Man sieht, dass die AsA Konzentrationen in Laufe der Expositionen entweder konstant blieben oder sich verringerten.

Abbildung 46 zeigt die Veränderung von oxidiertem Ascorbat (D-AsA). Sie variierte von 0,05 bis 1,1 mg/g FG, die Klone wiesen keine eindeutigen Unterschiede auf. Allerdings zeigte der S-NF Klone eine größere Variationsbreite. Vereinzelt ist zu sehen, dass eine Erhöhung der O₃-Konzentration zu einer Senkung der D-AsA- Konzentration führte.

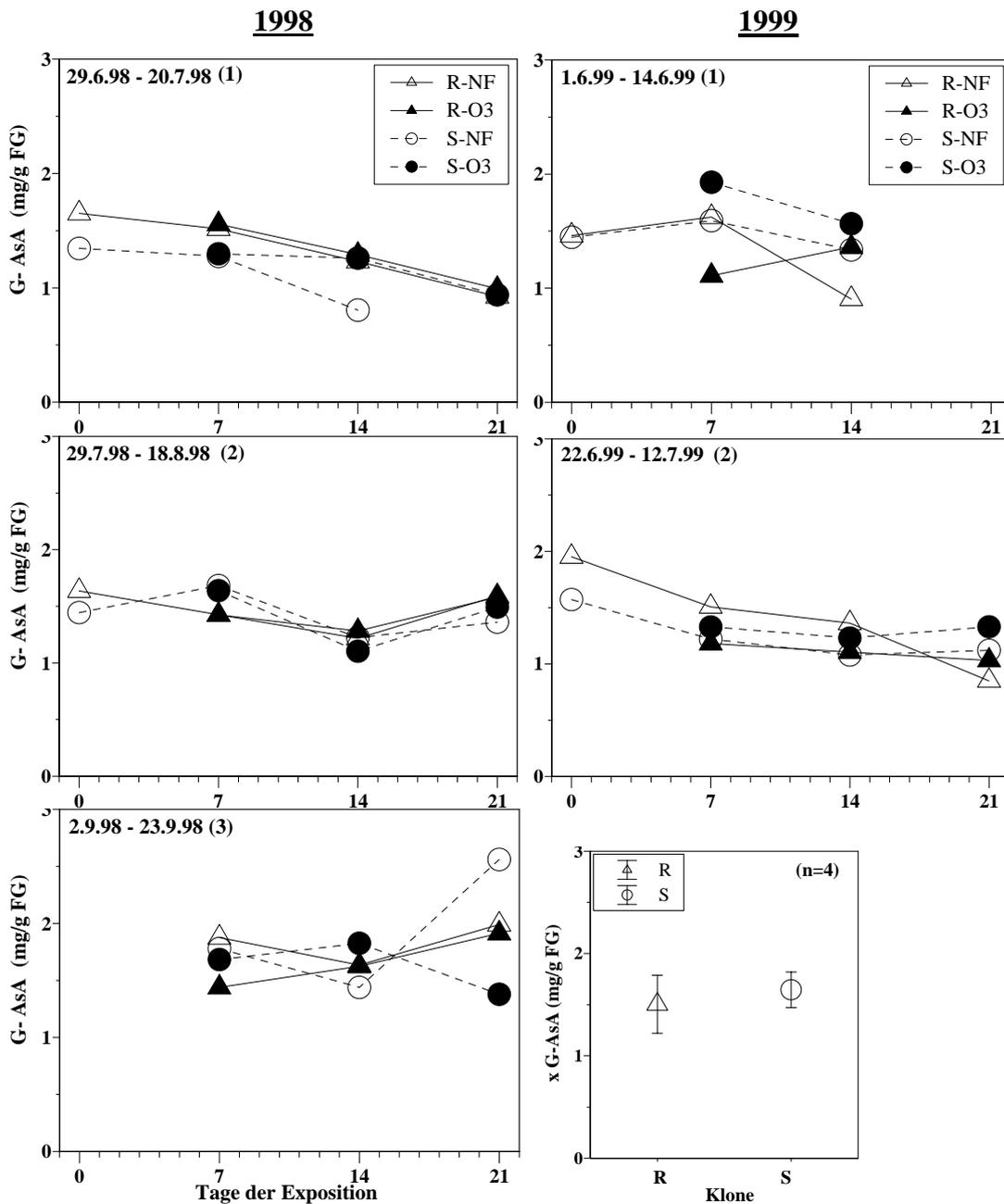


Abb. 44: Konzentrationsänderung des Gesamtascorbats (G-AsA) bei Gesamtblattmessung für die Jahre 1998 und 1999

(R-NF, S-NF= Kleekclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleekclone unter Ozon-einwirkung. Bild unten rechts: Mittelwert und Standardabweichung der Gesamtascorbat Konzentration von 4 unter gleichen Bedingungen aufwachsenden Kleepflanzen)

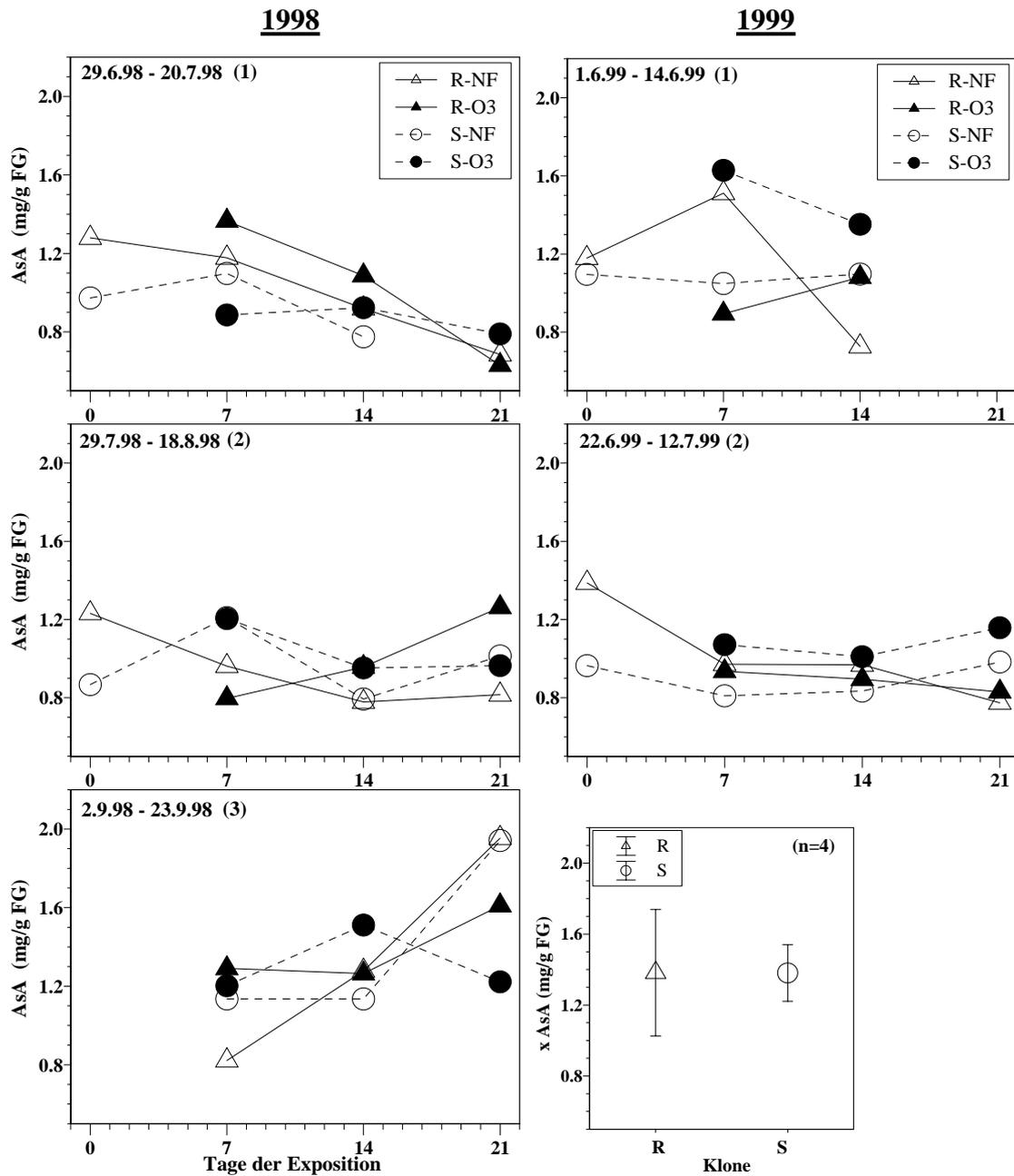


Abb. 45: Konzentrationsänderung des reduzierten Ascorbats (AsA) bei Gesamtblattmessung für die Jahre 1998 und 1999

(R-NF, S-NF= Kleekclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleekclone unter Ozonwirkung. Bild unten rechts: Mittelwert und Standardabweichung der reduzierten Ascorbatkonzentration von 4 unter gleichen Bedingungen aufwachsenden Kleepflanzen)

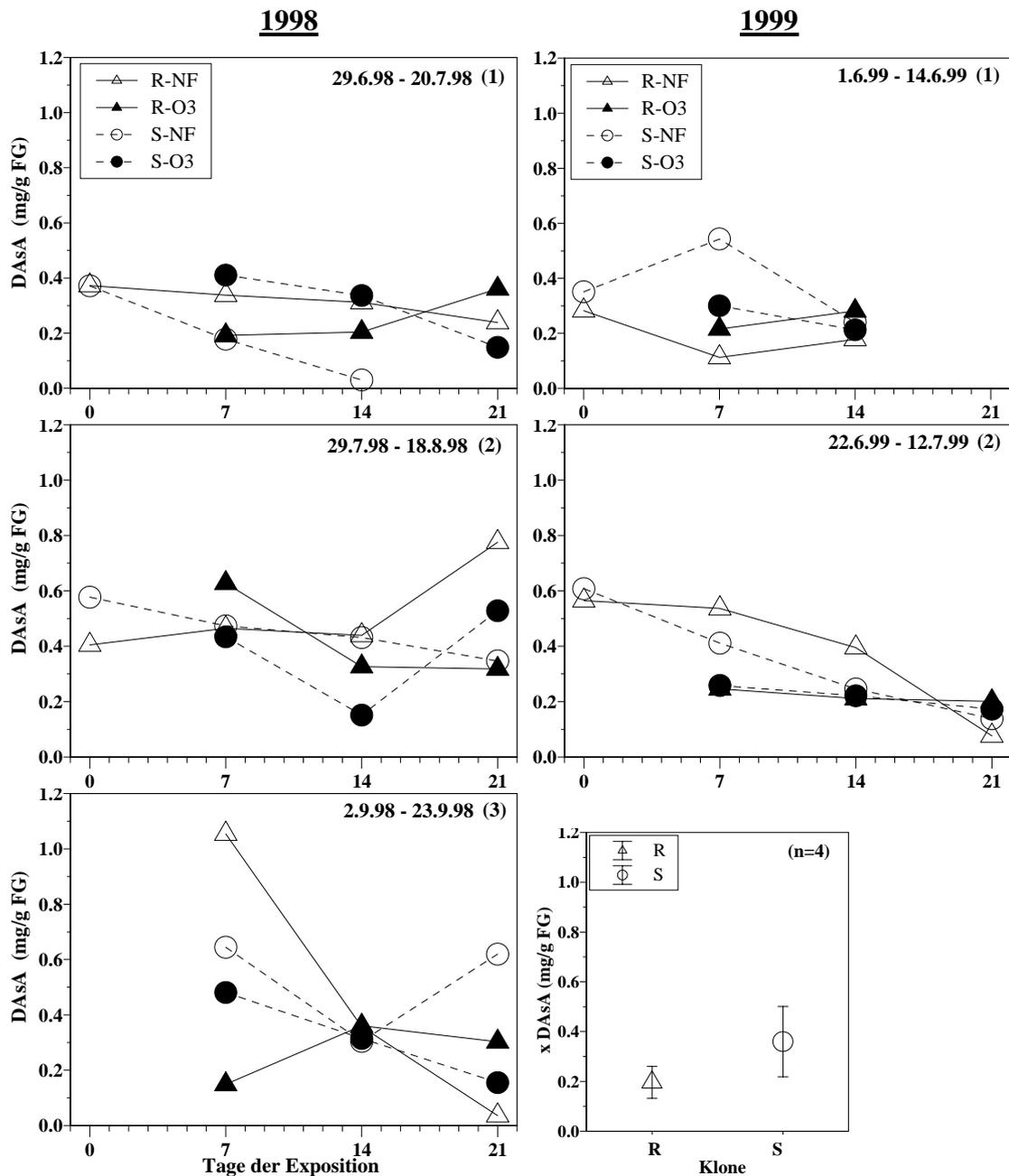


Abb. 46: Konzentrationsänderung des oxidierten Ascorbats (D-AsA) bei Gesamtblattmessung für die Jahre 1998 und 1999

(R-NF, S-NF= Kleekclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleekclone unter Ozon-einwirkung. Bild unten rechts: Mittelwert und Standardabweichung der oxidierten Ascorbatkonzentration von 4 unter gleichen Bedingungen aufwachsenden Kleepflanzen)

In Abbildung 47 ist der Redox-Status beider Klone dargestellt. Große Änderungen im Verhältnis $\text{Ascorbat}_{\text{red}} / \text{Ascorbat}_{\text{ges}}$ unter Ozon-einwirkung waren nicht zu erkennen. Unter Kontrollbedingungen lagen bei dem resistenten Klon ca. 80 % und bei dem sen-

sitiven Klon ca. 70 % des Ascorbats in der reduzierten Form vor. Unter Ozoneinfluss, wiesen beide Varianten einen höheren Anteil des reduzierten Ascorbats auf.

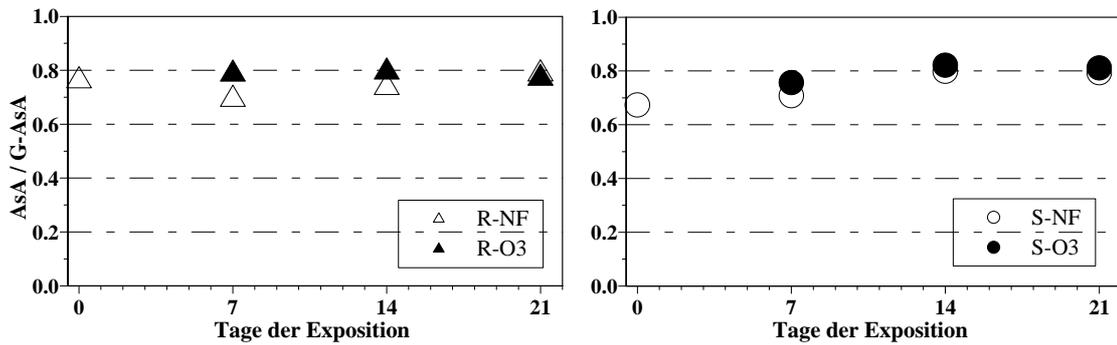


Abb. 47: Veränderung des Redox-Status ($Ascorbat_{red}/Ascorbat_{ges}$) für beide Klone (R-NF, S-NF= Kleeklone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleeklone unter Ozoneinwirkung).

Wie bereits erwähnt ist ein Zusammenfassen aller Behandlungen wegen der unterschiedlichen Dynamik des Ozons und anderer Klimaparameter, die je nach Jahr und Expositionszeitraum variieren, mit Vorsicht zu betrachten. Die Abbildung 48 soll somit nur einen Überblick vermitteln.

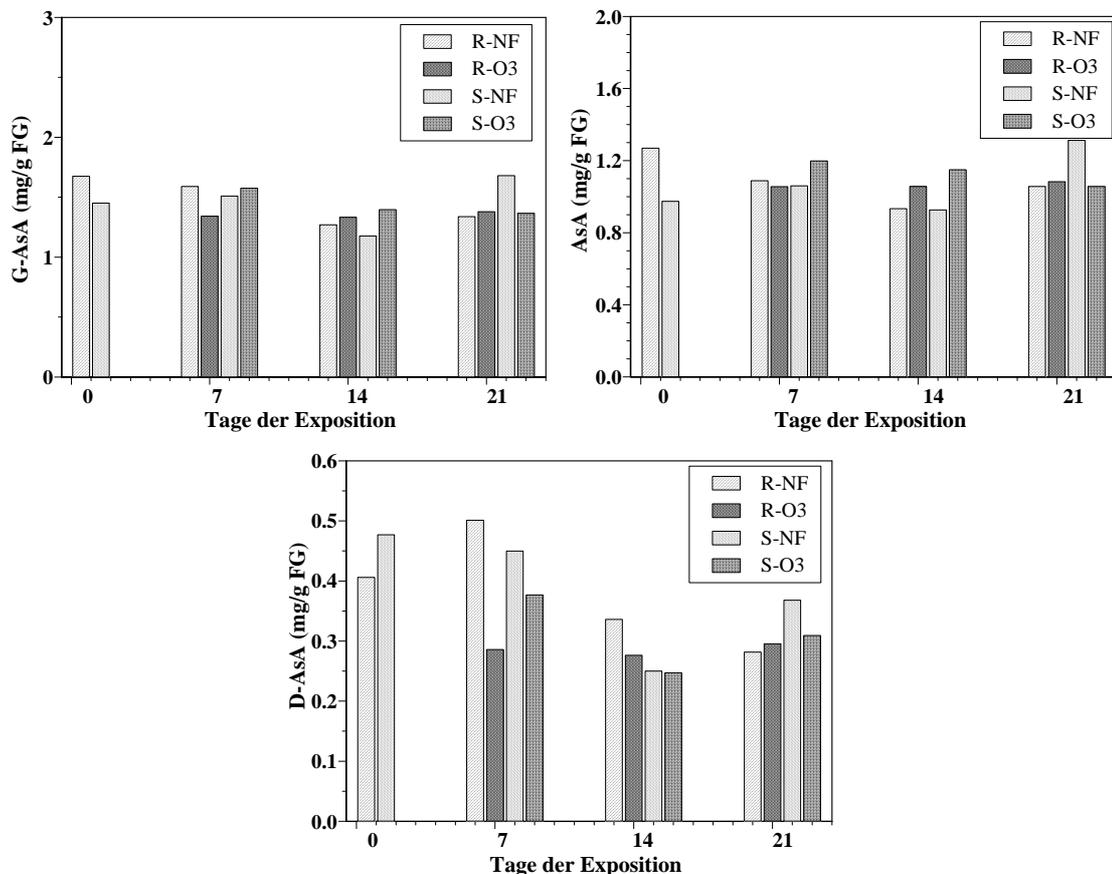


Abb. 48: Mittelwert der Gesamtascorbatmenge (G-AsA), der reduzierten (AsA) und oxidierten Ascorbatkonzentration (D-AsA) für beide Jahre

(R-NF, S-NF= Kleeclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleeclone unter Ozon-
einwirkung).

Zwischen den Behandlungen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Der Gehalt des Gesamt-Ascorbats war bei allen Behandlungen fast gleich. Ozon bewirkt keine großen Veränderungen. Tendenziell wies der sensitive Klon mehr reduziertes Ascorbat auf und die Kontrollpflanzen hatten am Ende der Expositionen einen höheren Ascorbatgehalt. Hinsichtlich der oxidierten Form zeigten sich noch geringere Differenzen.

Unspezifische Peroxidasen (POX)

Die POX-Aktivität in den Gesamtblattfraktionen ist in Abbildung 49 und 50 dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Startkonzentrationen bei beiden Klonen annähernd gleich sind. Unter Ozoneinwirkung sieht man einen Anstieg der POX-Konzentration bei dem sensitiven Klon sowohl im Verlauf der Expositionen als auch im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Im weiteren zeigt sich, dass die POX-Konzentration nicht mit der herrschenden Ozonkonzentration korreliert.

Im Jahr 1999 erkennt man bei dem sensitiven Klon bei allen drei Expositionen einen kontinuierlichen Anstieg der POX-Konzentration. Dieser ist bei den Ozon-behandelten Pflanzen am größten. Die POX-Aktivität im resistenten Klon blieb relativ konstant. Bei den ersten beiden Expositionen war die Ozonkonzentration in den Kammern am höchsten. Bei der letzten Exposition waren die Konzentrationen geringer und die Differenz zwischen den Kammern nicht so groß.

Die POX Aktivität lag für den resistenten Klon bei 55-80 U/g FG und für den sensitiven bei 80-130 U/g FG. Unter Ozoneinwirkung war ein deutlicher Aktivitätsanstieg zu erkennen. Dieser lag bei 45 % nach 14 Tage für den resistenten Klon und bei 178 % nach 14 Tage bei dem sensitiven Klon. Signifikante Unterschiede sind zwischen R-NF und S-O₃ Klon am 7.- 14.- und 21. Tag vorhanden. Zusätzlich gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen R-O₃ und S-O₃ am 14. Tag.

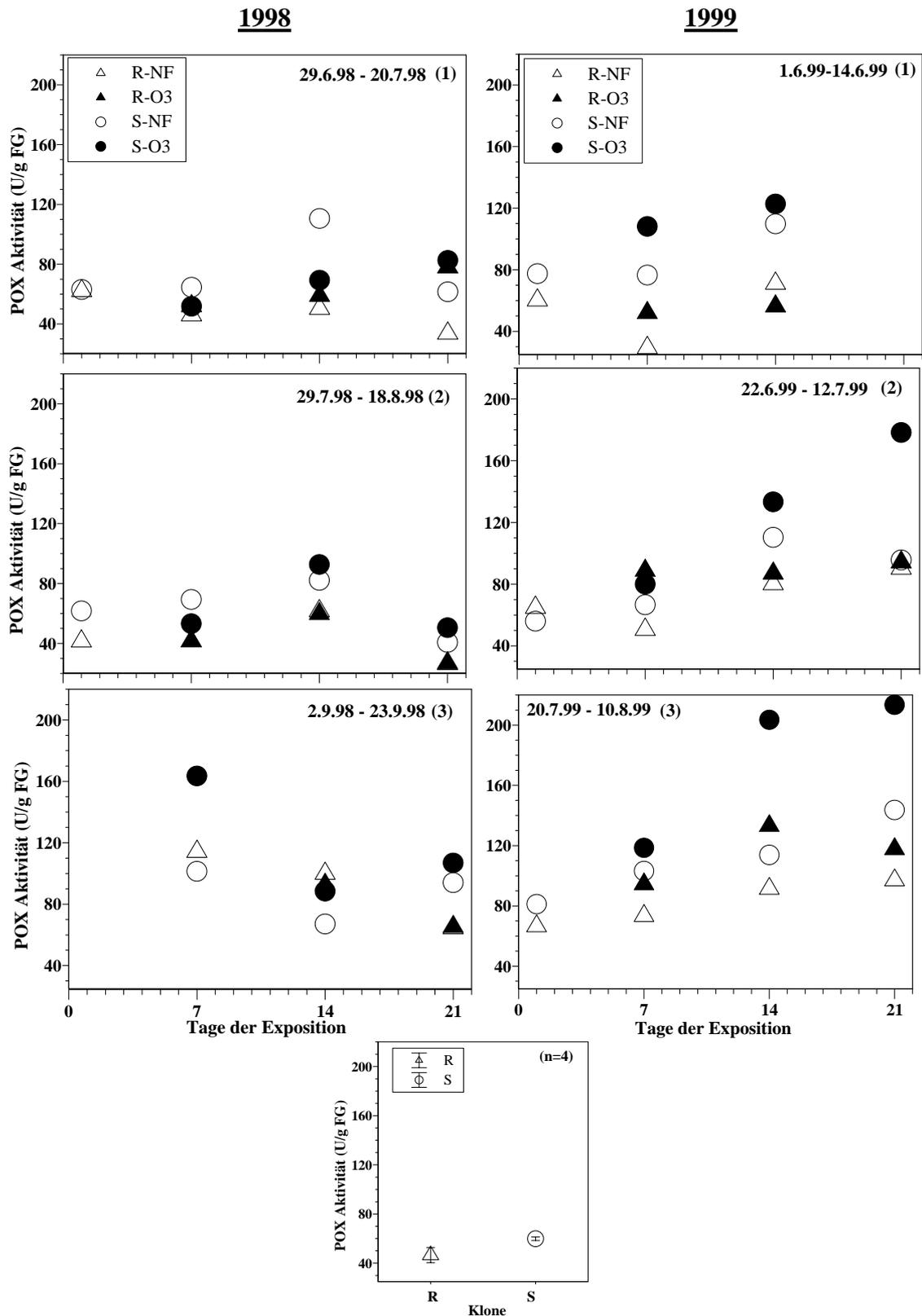


Abb. 49: Veränderung der POX-Aktivität bei der Gesamtblattfraktion für die Jahre 1998 und 1999 für alle drei Expositionen

(R-NF, S-NF= Kleeclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleeclone unter Ozoneinwirkung. Bild unten: Mittelwert und Standardabweichung der POX Aktivität von 4 unter gleichen Bedingungen aufwachsenden Kleepflanzen).

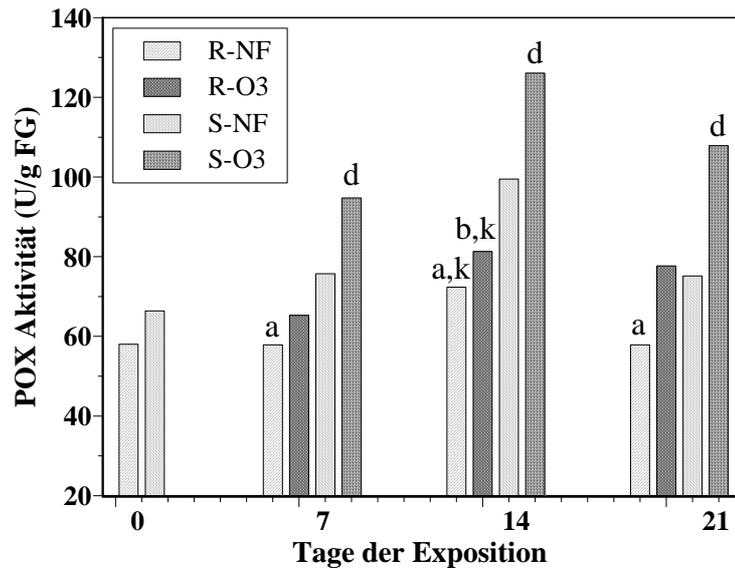


Abb. 50: Mittelwert der POX-Aktivität

(R-NF, S-NF= Kleekclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleekclone unter Ozoneinwirkung. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen wurden mit einem Buchstaben gekennzeichnet. Mindestens ein gemeinsamer Buchstabe zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen gibt).

Ascorbatperoxidase-Aktivität

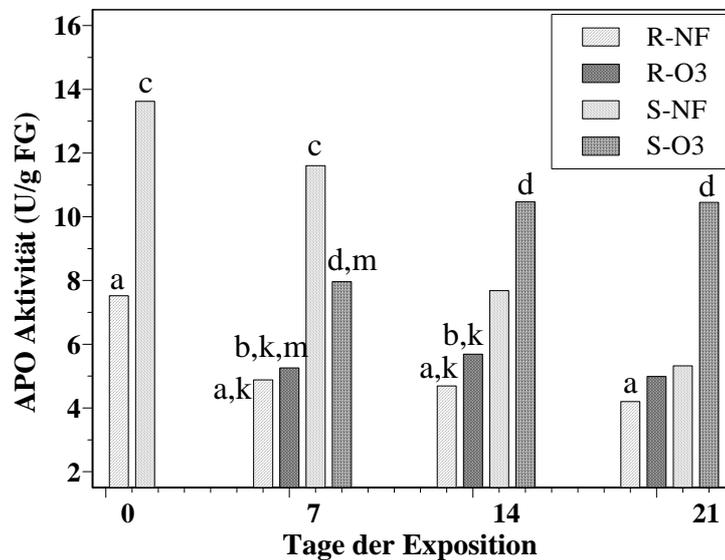


Abb. 51: Mittelwert der Gesamtblatt-Ascorbatperoxidase-Aktivität

(R-NF, S-NF= Kleekclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleekclone unter Ozoneinwirkung. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen wurden mit einem Buchstaben gekennzeichnet. Mindestens ein gemeinsamer Buchstabe zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen gibt).

Bei der Darstellung der Ergebnisse für die Ascorbatperoxidase-Aktivität wird auf die Darstellung der einzelnen Expositionen für die Gesamtblattfraktion verzichtet. In der Abbildung 51 sind alle Expositionen mit den entsprechenden Daten von beiden Jahren zusammengefügt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei beiden Klonen eine Aktivitätsverminderung während des Alterungsprozesses stattfindet. Von zu Beginn ca. 7,5 U/g FG sank die Aktivität um 47 % des Ausgangswertes für den resistenten Klon und von ca. 13,5 U/g FG um 63 % für den sensitiven. Der sensitive Klon wies sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Ozoneinwirkung eine höhere Aktivität auf. Ozoneinwirkung führte bei beiden Klonen zu einem Anstieg der APO-Aktivität. Signifikante Unterschiede fanden sich am 7. Tag (S-NF zu S-O₃).

3.5.1.2 Apoplastenfluid

Ascorbinsäure

In Abbildung 52 wird die Konzentration des Gesamtascorbats (G-AsA) im Apoplasten dargestellt. Im Vergleich zur Gesamtblattanalyse zeigt der Verlauf des Gesamtascorbats hier eindeutig, dass der Ascorbinsäurepool im Apoplasten viel empfindlicher auf Ozon reagiert. Die Kontrollen beider Klone hatten relativ ähnliche Werte bei allen Expositionen, aus der Reihe fällt nur die erste Exposition des Jahres 1999. Unter Ozoneinwirkung zeigte der sensitive Klon kontinuierlich die höchste Konzentration an Gesamt-Ascorbat. Die Ozondaten zeigen, dass 1998 die Differenz zwischen den Kammern ab dem 15. Tag minimal war, was sich auch bei den Ascorbatwerten widerspiegelt. In der zweiten Expositionsperiode waren die Klone den höchsten Ozonkonzentrationen ausgesetzt, was zur Folge hatte, dass hier auch die höchsten G-AsA Konzentrationen auftraten. Am 14. und am 21. Tag wies der behandelte sensitive Klon eine um 87 % höhere Konzentration auf als die Kontrolle. Obwohl der resistente Klon bei gleichen Bedingungen exponiert wurde, zeigte er keine Unterschiede.

Bei allen Expositionen wird erkennbar, dass je höher die Ozonkonzentration ist, desto höher ist auch der G-AsA Gehalt im Apoplast. Im Jahr 1999 zeigten die Kontrollwerte am Tag 0 der ersten Exposition schon erstaunlich hohe Werte an, was mit den Expositionsbedingungen der Pflanzen vor dem Versuch zu tun haben könnte. Die Konzentrationen erreichen auch hier Werte bis zu 11 µg/g FG, wie es schon bei der 2. Exposition des letzten Jahres der Fall war.

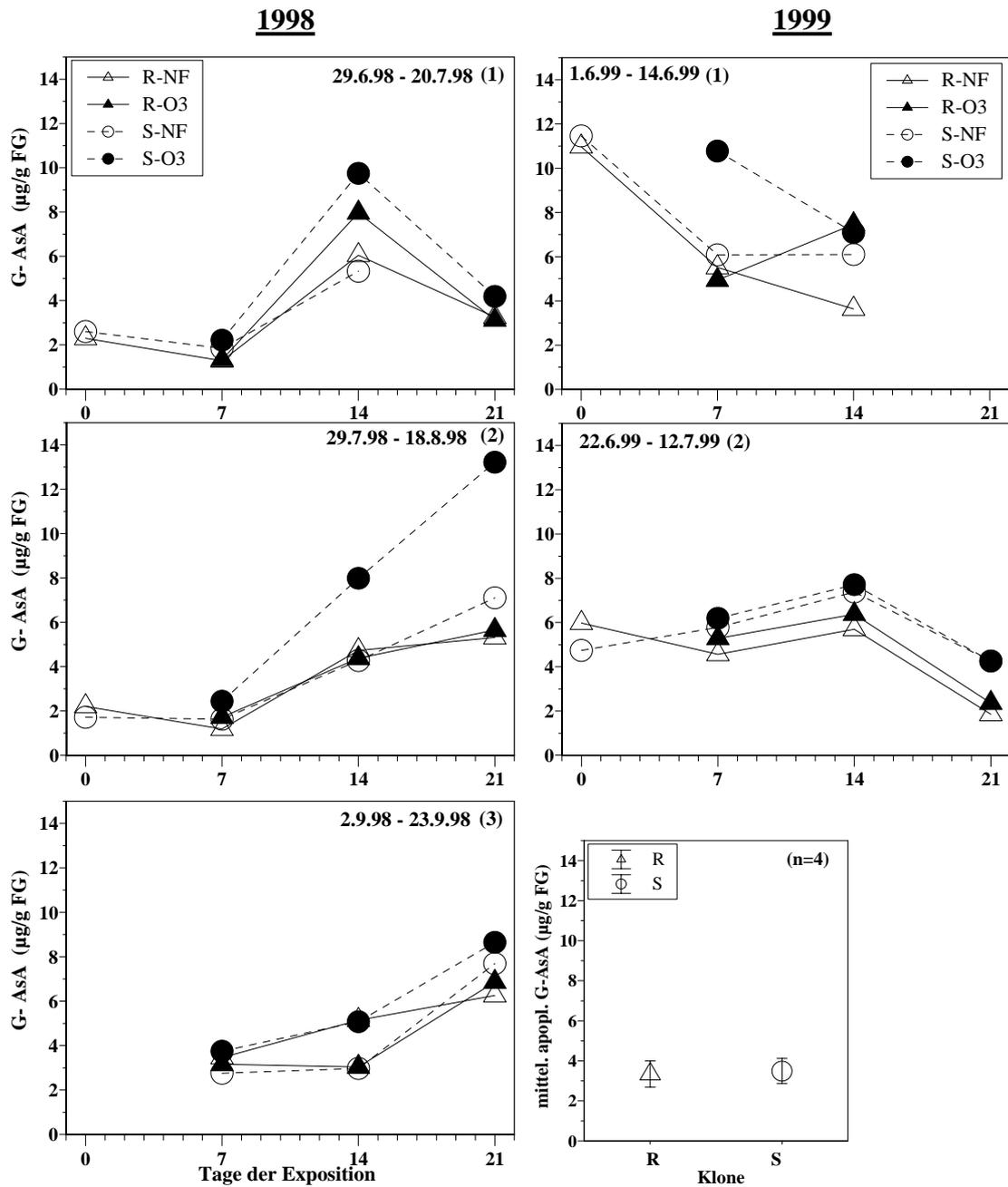


Abb. 52: Veränderung der apoplastischen Gesamtascorbat Konzentration (G-AsA) für die Jahre 1998 und 1999

(R-NF, S-NF= Kleeclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleeclone unter Ozoneinwirkung. Bild unten rechts: Mittelwert und Standardabweichung der apoplastischen Gesamtascorbat Konzentration von 4 unter gleichen Bedingungen aufwachsenden Kleeplantzen)

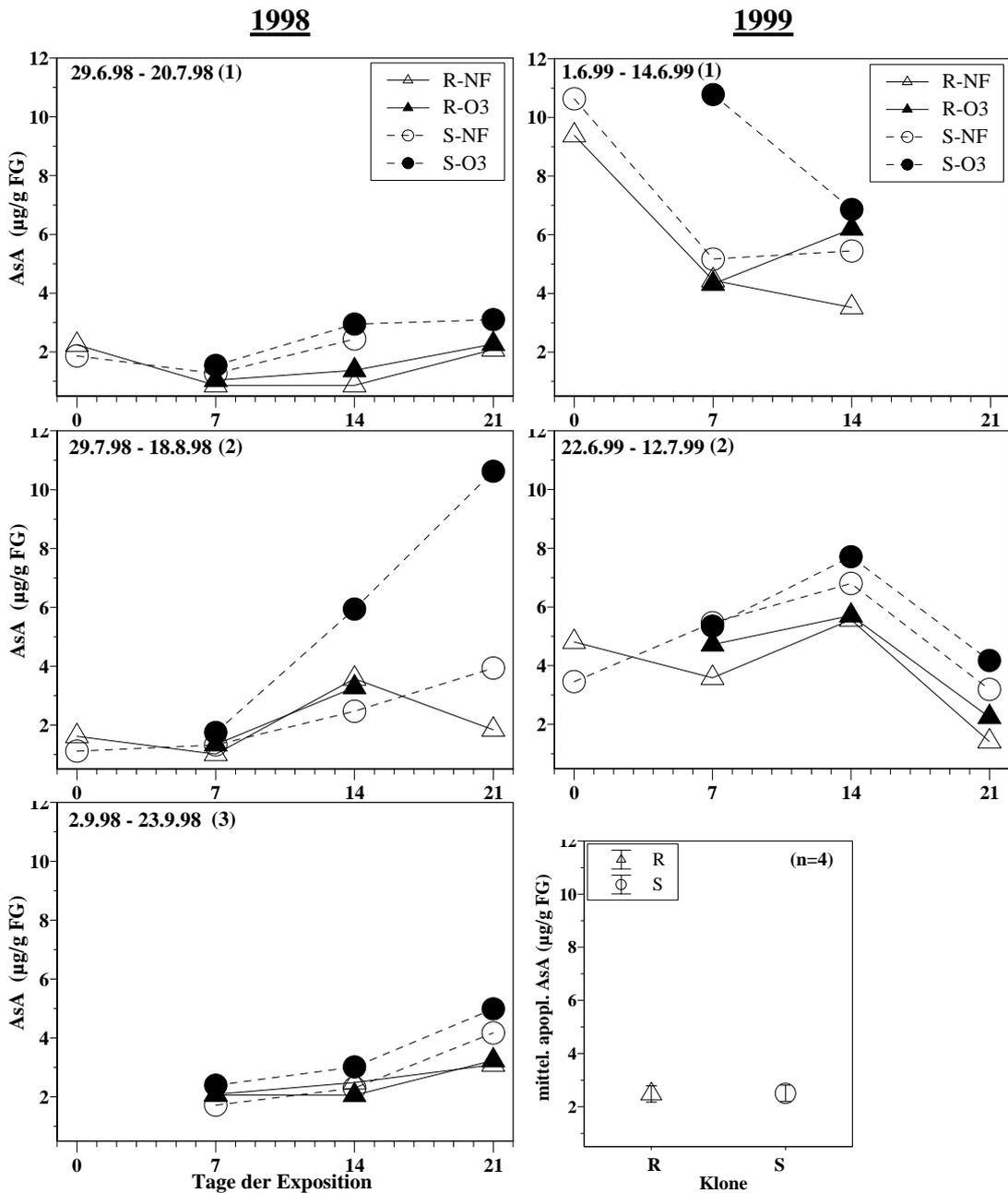


Abb. 53: Veränderung der apoplastischen reduzierten Ascorbatkonzentration (AsA) für die Jahre 1998 und 1999

(R-NF, S-NF= Kleekclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleekclone unter Ozoneinwirkung. Bild unten rechts: Mittelwert und Standardabweichung der apoplastischen reduzierten Ascorbatkonzentration von 4 unter gleichen Bedingungen aufwachsenden Kleepflanzen)

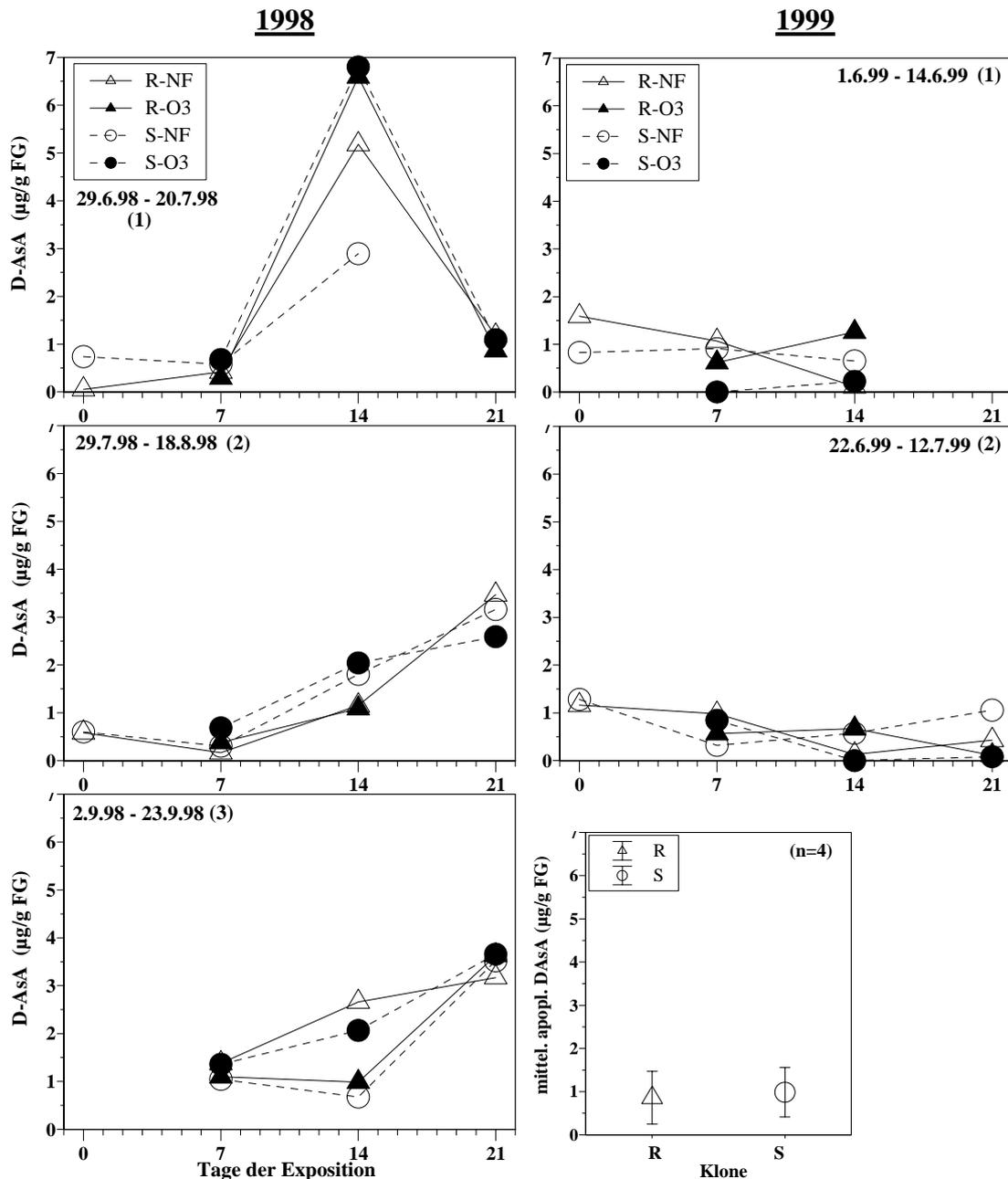


Abb. 54: Veränderung der apoplastischen oxidierten Ascorbatkonzentration (D-AsA) für die Jahre 1998 und 1999

(R-NF, S-NF= Kleekclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleekclone unter Ozoneinwirkung. Bild unten rechts: Mittelwert und Standardabweichung der apoplastischen oxidierten Ascorbatkonzentration von 4 unter gleichen Bedingungen aufwachsenden Kleepflanzen)

Beim 7. Tag beträgt auch hier die Konzentrationsdifferenz beim sensitiven Klon 77 %. Gleichzeitig zeigt sich, dass bei 3 von 5 Expositionen der Gehalt vermindert ist, was damit erklärt werden könnte, dass die Blätter älter wurden und abstarben. In der ersten Exposition im Jahr 1999 konnte am 21. Tag keine Messung vorgenommen werden, weil alle markierten Blätter schon abgestorben waren (Abb. 53). Der Verlauf des reduzierten

Ascorbats (AsA) im Apoplasten (Abb. 53) ist im Prinzip der gleiche, wie bei der Gesamtkonzentration. Das untermauert die oben getroffene Aussage, dass der größte Teil des Gesamtascorbats in der reduzierten Form vorliegt. Bei der ersten Exposition ist zu sehen, dass alle behandelten Pflanzen mehr reduziertes Ascorbat und die S-O₃ Pflanzen den höchsten Wert aufwiesen. Bei der zweiten Exposition ist der gleiche Verlauf zu vermerken. Schon ab dem 7. Tag hatte der S-O₃ einen höheren Wert als alle anderen und diese Differenz ist an den letzten zwei Infiltrationstagen am höchsten. Bei der dritten Exposition des gleichen Jahres sah man wieder die Tendenz, dass S-O₃ mehr reduziertes Ascorbat aufweist. Die Unterschiede zwischen den Behandlungen und den Varianten sind nicht groß, was auf die Witterungsbedingungen zurückzuführen ist. Die Konzentration des oxidierten Ascorbats (D-AsA) im Apoplasten (Abb. 54) unterliegt Schwankungen. In der ersten Exposition (1998) zeigte der S-O₃ einen 135 %igen Anstieg im Vergleich zu dem S-NF; R-O₃ dagegen nur einen 27 %igen Anstieg im Vergleich zu den R-NF. Diese Zunahme ist in keiner anderen Exposition der Fall, so dass sie aus der Reihe fällt.

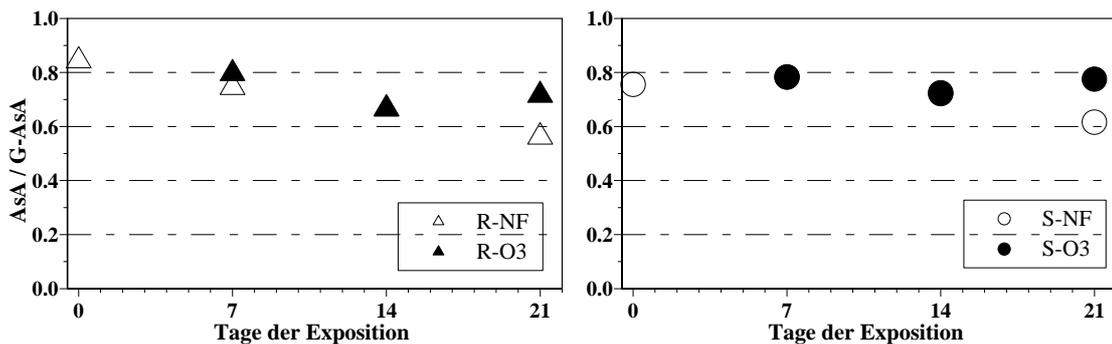


Abb. 55: Veränderung des apoplastischen Redox-Status für die Jahre 1998 und 1999

(R-NF, S-NF= Kleekclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleekclone unter Ozonwirkung)

Große Änderungen im Verhältnis $\text{Ascorbat}_{\text{red}}/\text{Ascorbat}_{\text{ges}}$ im Apoplasten unter Ozonwirkung waren nicht zu erkennen (Abb. 55). Der Verlauf ist in beiden Klonen ähnlich. Unter Kontrollbedingungen lagen bei beiden Klonen ca. 80 % des Ascorbats in der reduzierten Form vor. Ozonwirkung führte entgegen aller Vermutungen nicht zu einer deutlichen Verminderung des reduzierten Ascorbats.

In Abbildung 56 sind nochmals alle Daten für gesamt- (G-AsA), reduzierte- (AsA) und oxidierte- (D-AsA) Ascorbatkonzentration zusammengefügt. Erkennbar ist die Tendenz, dass der S-O₃ kontinuierlich die höchsten Werte aufweist.

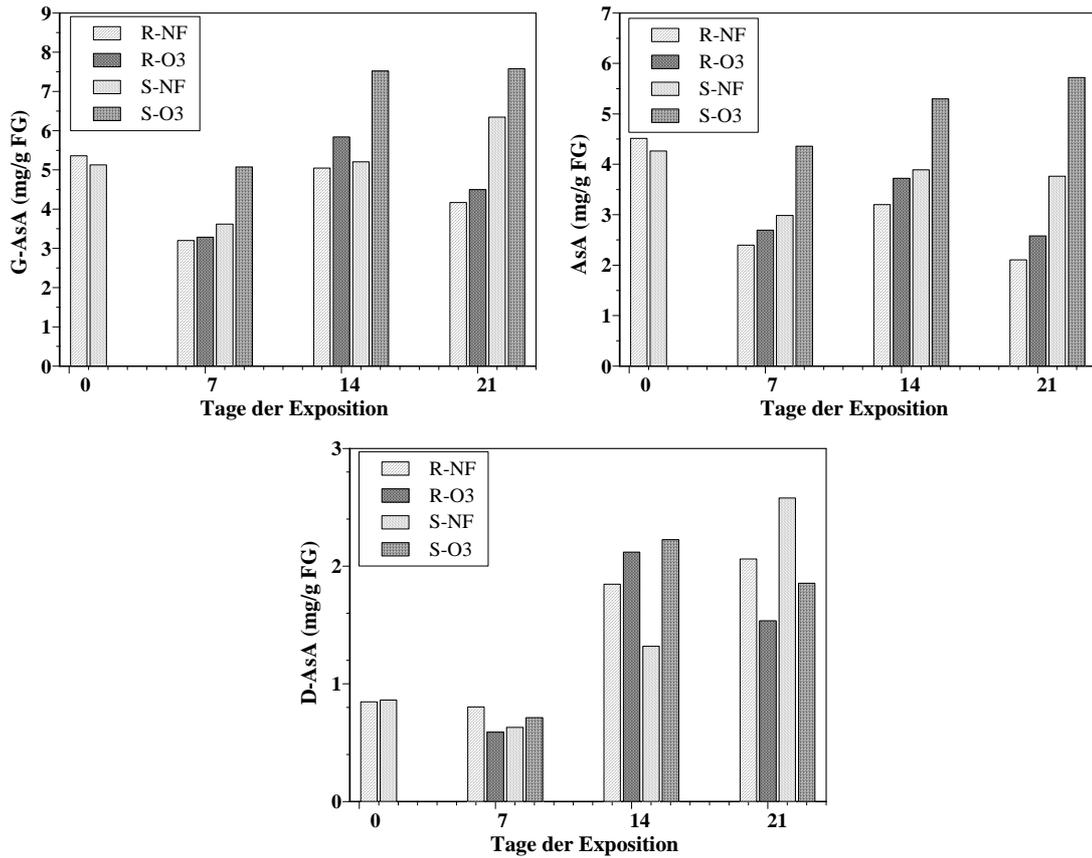


Abb. 56: Mittelwert der Gesamtascorbatmenge (G-AsA), der reduzierten (AsA) und oxidierten Ascorbatkonzentration (D-AsA) für beide Jahre (R-NF, S-NF= Kleeclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleeclone unter Ozoneinwirkung)

Tabelle 7 zeigt die Anteile von Gesamtascorbat (G-AsA) und von reduziertem (AsA) und oxidiertem (D-AsA) Ascorbat im Apoplasten. Dabei zeigt sich, dass sich im Apoplasten des S-O₃ Klon mehr Ascorbat als im R-O₃ befindet. (R-O₃ Klon bis zu 0,62 % G-AsA, S-O₃ Klon bis zu 0,89 %). Auch der Anteil von reduziertem Ascorbat ist größer.

Tabelle 7: Prozentualer Anteil von Gesamt- (G-AsA), reduziertem (AsA) und oxidiertem Ascorbat (D-AsA), im dem Apoplast

Behandlung	G-AsA		AsA		D-AsA	
	von	bis	von	bis	von	bis
R-NF	0,08	0,75	0,07	0,80	0,01	8,81
R-O ₃	0,09	0,62	0,08	0,64	0,05	3,23
S-NF	0,10	0,80	0,11	0,97	0,06	9,68
S-O ₃	0,15	0,89	0,15	1,10	0	2,36

Unspezifische Peroxidasen (POX)

Bei den Infiltrationsbefunden für das Jahr 1998 können eindeutige Aussagen getroffen werden. Die Aktivität der POX im Apoplasten (Abb. 57) des mit Ozon behandelten sensitiven Klons nahm fast kontinuierlich zu. Im Gegensatz dazu blieb die Aktivität im resistenten Klon auf gleichem Niveau. Bei den behandelten Pflanzen zeigte sich, dass bei geringeren O₃ Konzentrationen die POX-Werte beeinflusst wurden. Es hat den Anschein, dass eine Aktivierung zeitverzögert erfolgte, wobei nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, dass es sich hierbei auch um eine Alterungserscheinung handeln könnte.

In der zweiten Exposition dieses Jahres herrschte die höchste O₃ Konzentration, was zu einer großen Aktivität der POX geführt hat. Die Aktivität bei S-O₃ stieg bis zu 733 % an. Zum gleichen Zeitpunkt waren auch die G-AsA und die AsA Konzentration im Apoplasten sehr erhöht. Bei der letzten Exposition waren keine großen Unterschiede zu erkennen, was auch für das Jahr 1999 gilt. Bei der zweiten und dritten Exposition 1999 wurde deutlich, dass der sensitive Klon mehr Aktivität aufweist. Die Aktivität stieg von 0,5 bis zu 3 U/g FG in der zweiten und von 1,5 bis zu 4,5 U/g FG bei der dritten Exposition, was einem Anstieg von 500 % und 300 % entspricht. Auffällig ist bei der letzten Exposition, dass die Werte aller Behandlungen hier viel höher lagen als bei den vorherigen Zyklen.

In der Abbildung 58 sind die Ergebnisse aller Expositionen zusammenfassend aufgeführt. Es zeigte sich, dass der S-O₃ die höchste POX- Aktivität nach Ozoneinwirkung erreicht. Der S-O₃ unterschied sich bei Tag 21 signifikant von den anderen drei Behandlungen. Es war eine Erhöhung der POX Aktivität für den sensitiven Klon von 3,5 U/g FG innerhalb von 21 Tagen zu verzeichnen was einer 350 %igen Zunahme entsprach.

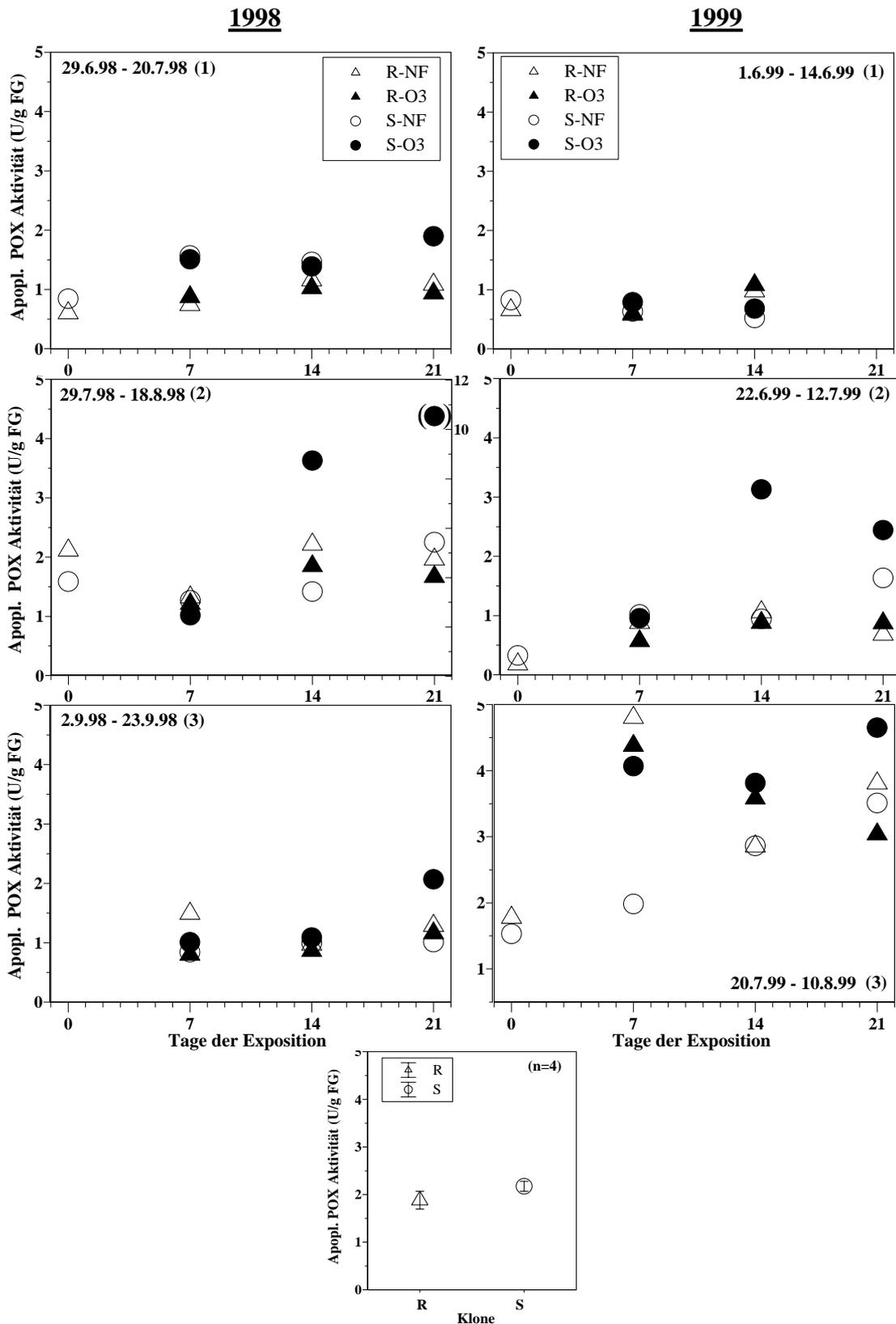


Abb. 57: Apoplastische POX Aktivität für das Jahr 1998 und 1999

(R-NF, S-NF= Kleeclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleeclone unter Ozoneinwirkung. Bild unten rechts: Mittelwert und Standardabweichung der apoplastischen POX Aktivität von 4 unter gleichen Bedingungen aufwachsenden Kleeplflanzen; Bei der 2.Exposition des Jahres 1998 bezieht sich der Wert in Klammern an der zweiten Skala)

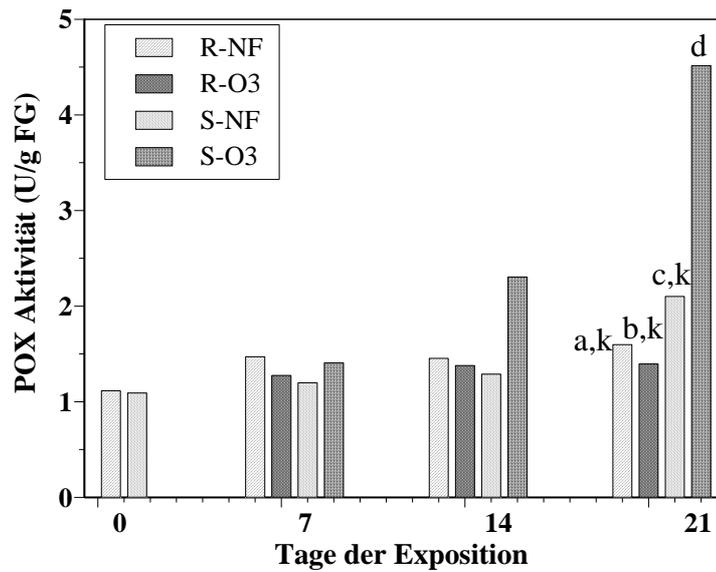


Abb. 58: Mittelwert der apoplastischen POX-Aktivität für beide Jahre

(R-NF, S-NF= Kleeclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleeclone unter Ozoneinwirkung. Die signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen wurden mit einem Buchstaben gekennzeichnet. Mindestens ein gemeinsamer Buchstabe zeigt, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen gibt).

In Tabelle 8 wird ersichtlich, wieviel Prozent der POX-Aktivität sich im Apoplasten befindet. Es zeigen sich große Variationen. Deutlich zu sehen ist, dass bei S-O₃ deutlich mehr POX-Aktivität nachgewiesen werden konnte (bis 21 %). Im resistenten Klon sind kaum Unterschiede zwischen Kontrolle und Ozonbehandlung zu verzeichnen.

Tabelle 8: Prozentualer Anteil der POX-Aktivität, die sich in dem Apoplasten befindet

Behandlung	POX im Apoplasten (%)	
	von	bis
R-NF	0,27	7,46
R-O ₃	0,64	6,18
S-NF	0,47	5,53
S-O ₃	0,55	20,89

Ascorbatperoxidase-Aktivität

Die apoplastische APO-Aktivität ist bei beiden Klonen zu Beginn der Versuchsreihe bei fast allen Expositionen auf gleichem Niveau (Abb. 59). Es sind keine eindeutigen Verläufe zu verzeichnen.

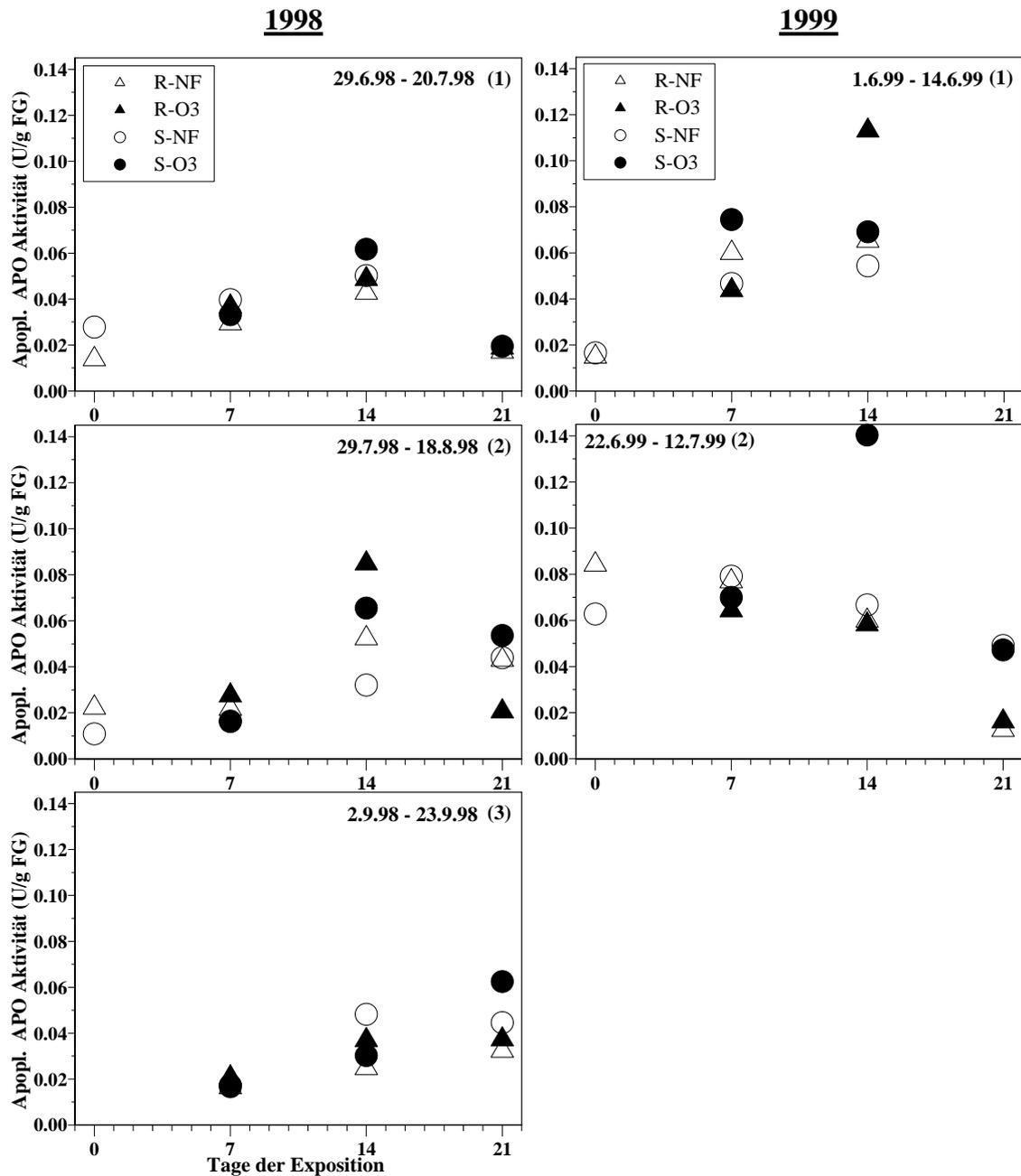


Abb. 59: Veränderung der apoplastischen APO Aktivität für das Jahr 1998 und 1999 für alle drei Expositionen

(R-NF, S-NF= Kleeclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleeclone unter Ozoneinwirkung)

Zeitweilig war ein Anstieg der APO-Aktivität zu erkennen wie z. B. bei der ersten Exposition des Jahres 1998. Während der ersten Expositionsperiode folgten nach 5 Tagen erhöhter Ozonkonzentrationen zwei Tage mit Konzentrationen unter 50 ppb, was dazu geführt haben könnte, dass am 7. Tag alle Werte annähernd gleich waren. Vom 7. bis 14. Tag waren die O₃-Konzentrationen nicht sehr hoch, dennoch war eine Zunahme der APO-Aktivität bei S-O₃ zu erkennen. Bei der zweiten Exposition des gleichen Jahres hatte der resistente Klon am Anfang den höchsten Wert. Nachdem die Klone 7 Tagen bei einer Konzentration von 60-70 ppb exponiert wurden, wies hier R-O₃ den höchsten Wert auf. Die Ozondifferenz zwischen der Ozon- (+O₃) und der Kontroll-(NF) Kammer war größer, als bei der ersten Exposition. Vom 7. bis 14. Tag erreichte die Ozonkonzentration die 100 ppb-Marke, was zur Folge hatte, dass die APO-Konzentration in den Pflanzen erhöht waren.

Die dritte Exposition des Jahres 1998 hatte über den ganzen Zeitraum die niedrigsten Ozonwerte. Die APO-Konzentration war am 14. Tag bei S-NF am höchsten. Am 21. Tag nachdem sich die Ozonkonzentration erhöht hatte, stieg die APO-Aktivität bei S-O₃ an.

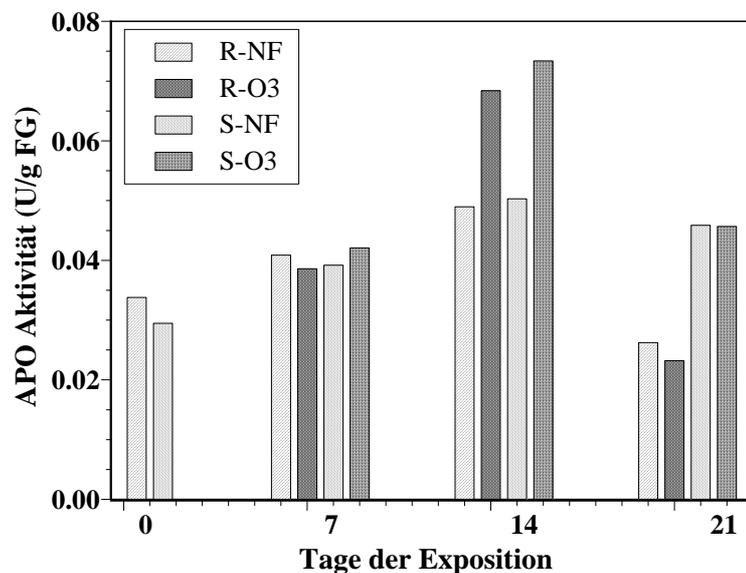


Abb. 60: Mittelwert aller Expositionen der apoplastischen Ascorbatperoxidase Aktivität (R-NF, S-NF= Kleekclone unter Kontrollbedingungen; R-O₃, S-O₃= Kleekclone unter Ozoneinwirkung. Bild unten rechts: Mittelwert und Standardabweichung der apoplastischen APO Aktivität von 4 unter gleichen Bedingungen aufwachsenden Kleepflanzen)

In Abb. 60 sind alle Expositionen von beiden Jahren sowie der Mittelwert der apoplastischen Ascorbatperoxidase Aktivität dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen.

Tabelle 9: Prozentualer Anteil der APO-Aktivität, die sich in dem Apoplast befindet

Behandlung	APO im Apoplasten (%)	
	von	bis
R-NF	0,16	1,47
R-O ₃	0,32	2,10
S-NF	0,11	1,02
S-O ₃	0,45	1,29

Aus Tabelle 9 wird ersichtlich, wieviel Prozent der APO-Aktivität sich im Apoplasten befindet. Der resistente Klon weist bei beiden Behandlungen prozentual eine höhere APO Aktivität im Apoplasten auf als der sensitive Klon.

3.5.2 Blattanatomie

Blattstruktur der beiden Kleeklone

Sehr deutliche und flächenbezogen sehr umfangreiche Ozonschäden waren an den Blättern des sensitiven Klons schon nach kurzer Zeit zu erkennen. Der resistente Klon wies nur einzelne, vergleichsweise unscheinbare Blattschäden auf. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen sollten belegen ob blattanatomische Unterschiede zwischen den Klonen vorhanden sind.

In den Abbildungen 61 und 62 wurden Blattquerbrüche der beiden Kleeklone vergleichend gegenübergestellt. Die Blattstärke des resistenten Klons beträgt ca. 150 µm und ist somit wesentlich größer als der des sensitiven Klons. Das Palisadenparenchym trägt ganz wesentlich zu diesem Unterschied bei!

Der sensitive (Abb. 62) weist im Vergleich mit dem resistenten Klon (Abb. 61) einen auffällig größeren Anteil Schwammparenchym und am Mesophyll ein anteilig größeres Interzellularvolumen auf. Dazu tragen auch die vielen rundlichen Palisadenparenchymzellen der sensitiven Variante bei.

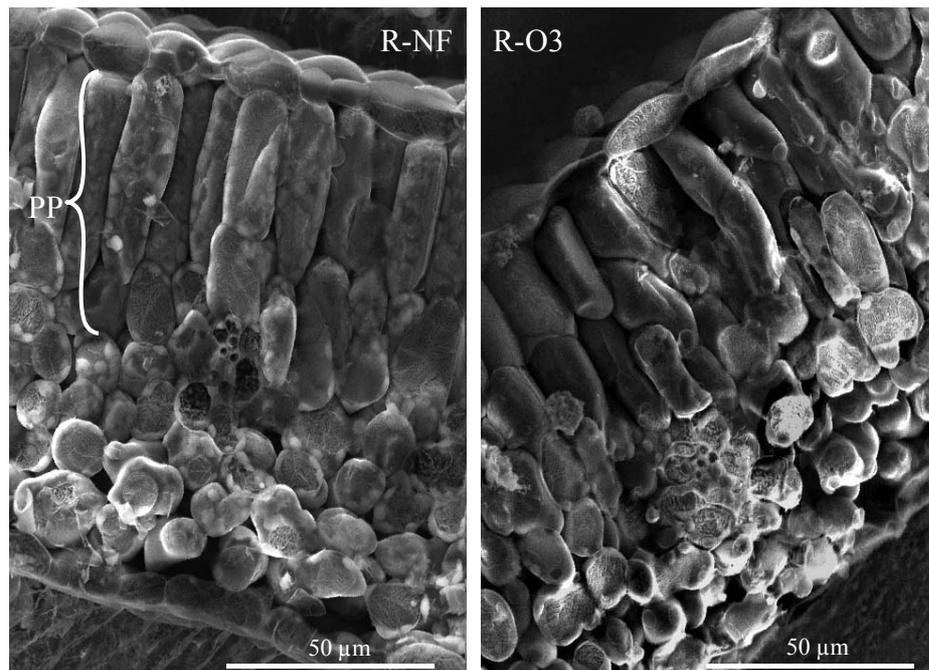


Abb. 61: Blattquerschnitte der Kontrollpflanze (R-NF) und des ozonbehandelten resistenten Klons (R-O₃).

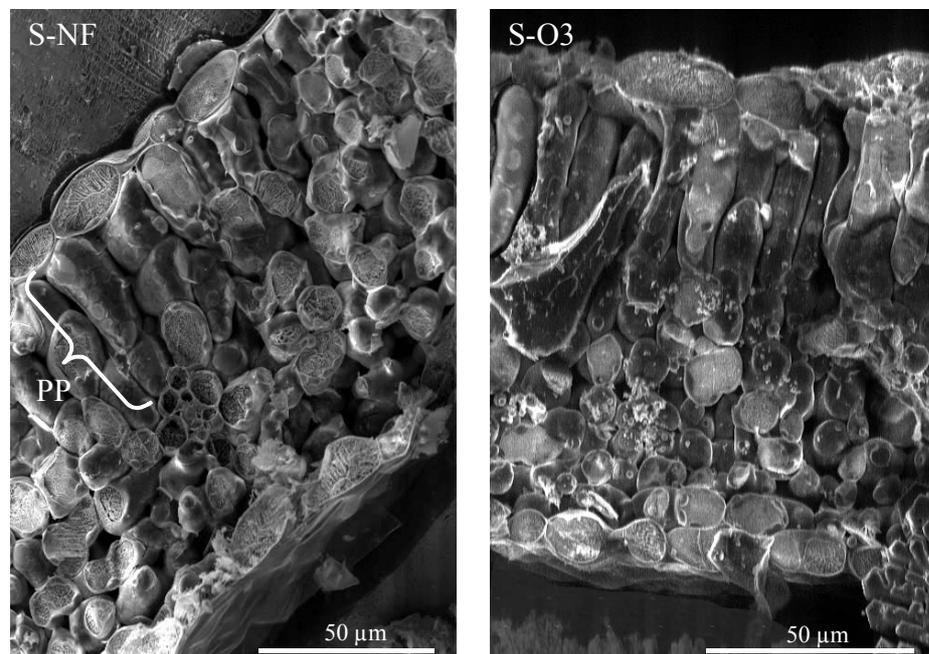


Abb. 62: Blattquerschnitte der Kontrollpflanze (S-NF) und des ozonbehandelten sensiblen Klons (S-O₃).

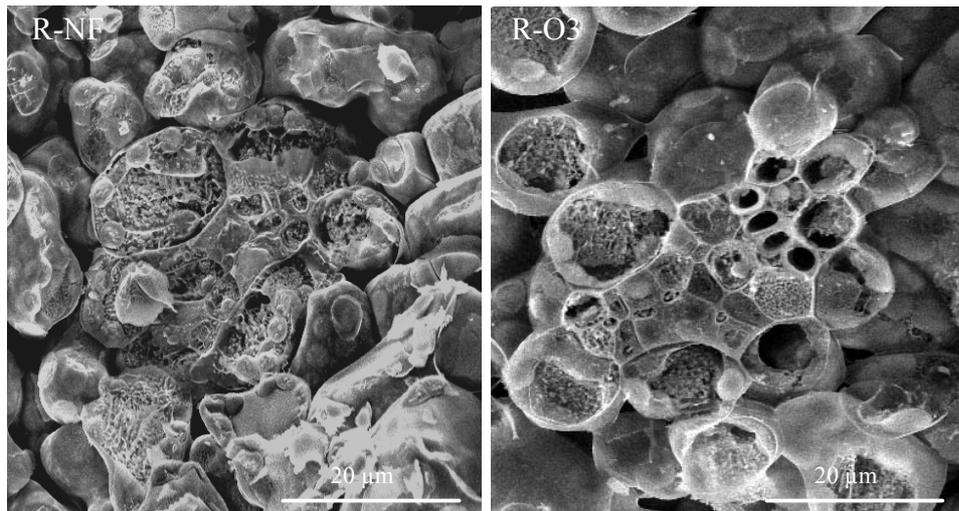


Abb. 63: Leitbündel der Kontrollpflanze (R-NF) und des ozonbehandelten resistenten Klons (R-O₃).

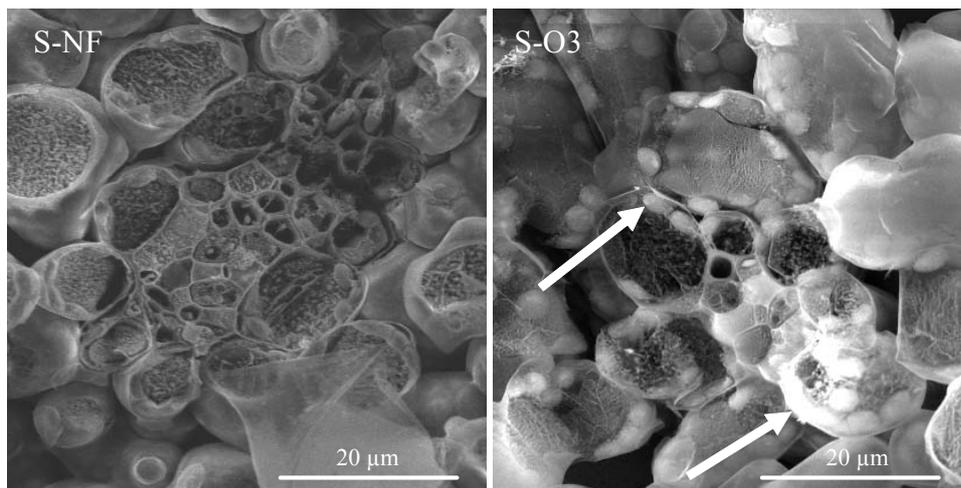


Abb. 64: Leitbündel der Kontrollpflanze (S-NF) und des ozonbehandelten sensitiven Klons (S-O₃).

Die Leitbündel und das umliegende Schwammparenchym bei beiden Kleeclonen unterscheiden sich strukturell nur wenig (Abb. 63 und 64). Auffällig ist jedoch in Abbildung 64 der hohe elektronenoptische Kontrast bei dem ozonbehandelten sensitiven Klon. Die hohe Elektronendichte auf den Chloroplasten (Aufladung - siehe Pfeil) war ein gut reproduzierbares Charakteristikum. Dieses Phänomen gilt als Hinweis auf geringe elektrische Leitfähigkeit.

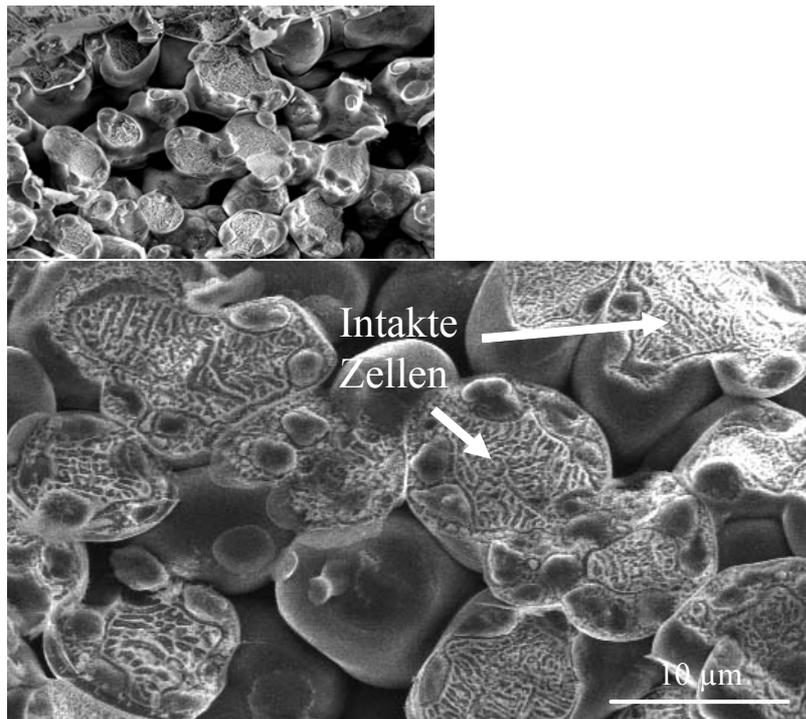


Abb. 65: Schwammparenchym des ozonbehandelten resistenten Klons

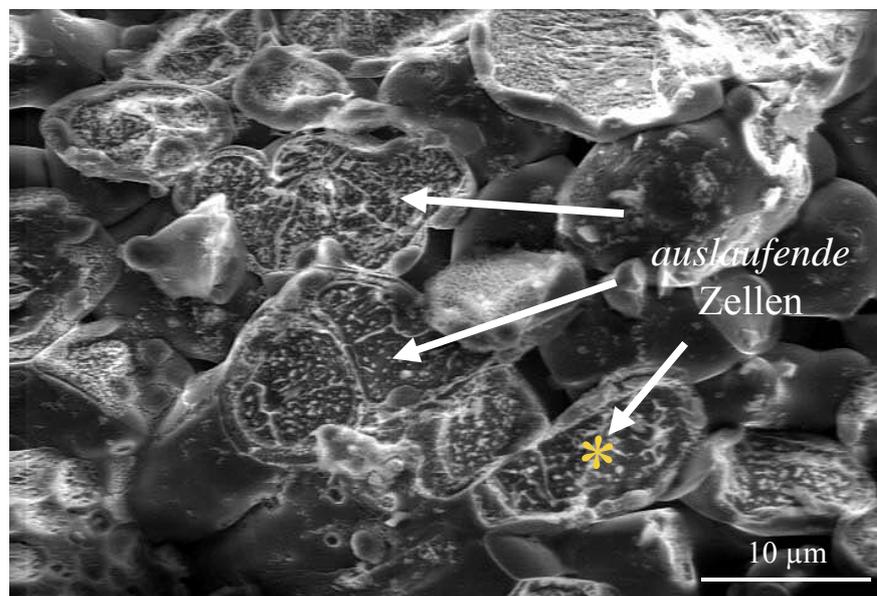
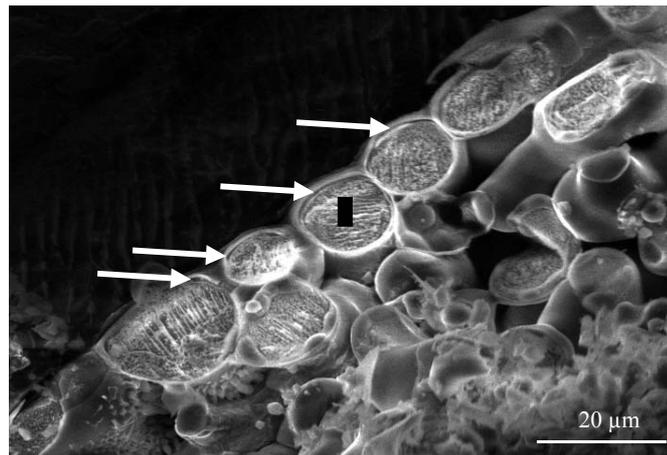


Abb. 66: Schwammparenchym des ozonbehandelten sensitiven Klons (* : Kristallform)



■ Das schwarze Feld kennzeichnet den Messbereich für EDXA

Abb. 67: Ablösung des Protoplasten von der Epidermiszellwand bei dem mit Ozon behandelten sensitiven Klon.

Deutliche Strukturveränderungen bewirkte Ozon im Schwammparenchym des sensitiven Klons (Abb. 66; siehe zum Vergleich den resistenten Klon in Abb. 65). Nachgewiesen werden konnten z.B. kollabierende Zellen (siehe intakte Zellen in Abb. 65). In Abbildung 66 ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen ihre Turgeszenz verloren haben (Pfeil) und Zellsaft in den Apoplasten entweicht. Die Kristallform in den auslaufenden Zellen ist ein Hinweis auf den beginnenden Tod dieser Zellen. Das Plasmalemma verliert ihre Permeabilität, die Zelle ihre Form, Wasser und Salze.

In den Epidermiszellen erfolgte (Abb. 67) eine Ablösung des Protoplasten von der Zellwand. Allerdings ist das Ausmass geschädigter Zellen in dem Schwammparenchym (durch die Zelldegeneration) grösser als in der Epidermis.

Die Blattoberflächen weisen weitere strukturelle Unterschiede zwischen den Klonen auf (Abb. 68 und 69). Es ist deutlich erkennbar, dass die Stomata bei dem sensitiven im Gegensatz zum resistenten Klon leicht eingesenkt sind und die Epidermiszellen turgeszenter erscheinen (Pfeil).

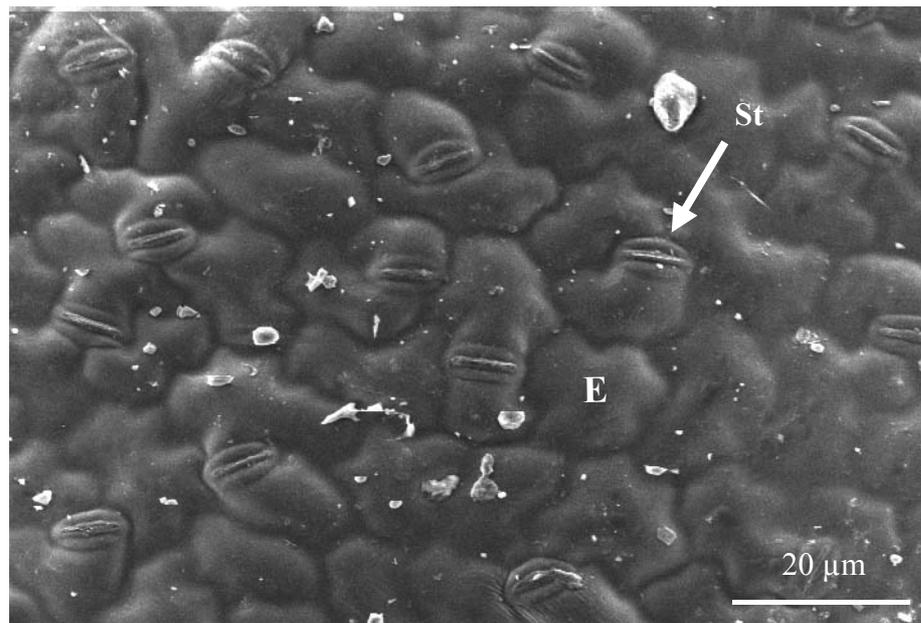


Abb. 68: Adaxiale Blattoberfläche des resistenten Kleeklons (St= Stomata, E= Epidermiszelle)

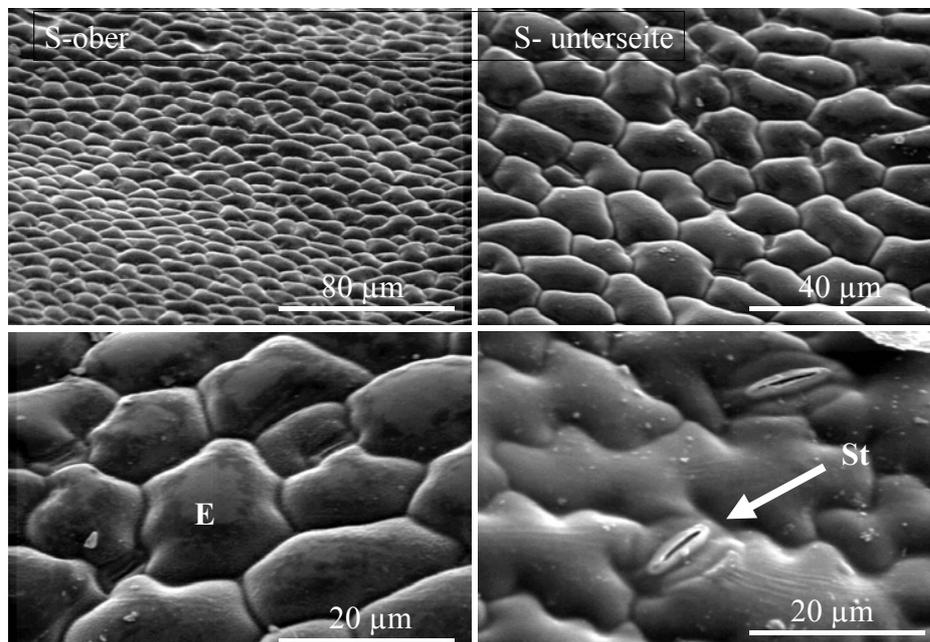


Abb. 69: Abaxiale und adaxiale Blattoberfläche des sensitiven Kleeklons (St= Stomata, E= Epidermiszelle)

Elementanalyse auf struktureller Ebene

Schon die Strukturanalytik gab erste Hinweise auf die Beeinflussung des Vakuoleninhaltes durch Ozon (u.a. Schwammparenchym; Abb. 66). Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht eine Elementanalyse in Einzelzellen bzw. Zellkompartimenten wie z.B. der Vakuole. Die Eindringtiefe des Messstrahles und das angeregte Probenvolumen waren jedoch messtechnisch bedingt leider zu gross um eine eindeutige Messung der Zellwand zu ermöglichen. Die EDX-Analyse wurde in den folgenden Zelltypen durchgeführt: Obere Epidermis (eu), Palisadenparenchym (pp), Schwammparenchym (sp), untere Epidermis (el). Es wurde in gefrorenen und in gefriergetrockneten Proben gemessen. Im gefrorenen Zustand wird das Wasser und der darin gelöste Sauerstoff mitgemessen. Im getrockneten Zustand ist ausschliesslich fest gebundenes Wasser in der Probe vorhanden und der Massenanteil von N, Na, Mg, P, S, Cl, K und Ca entsprechend höher als im gefrorenen. In den Abbildungen (70 und 71) werden die Gewichtsprozentanteile (Wt %) der einzelnen Elemente im gefriergetrockneten Zustand gegenübergestellt.

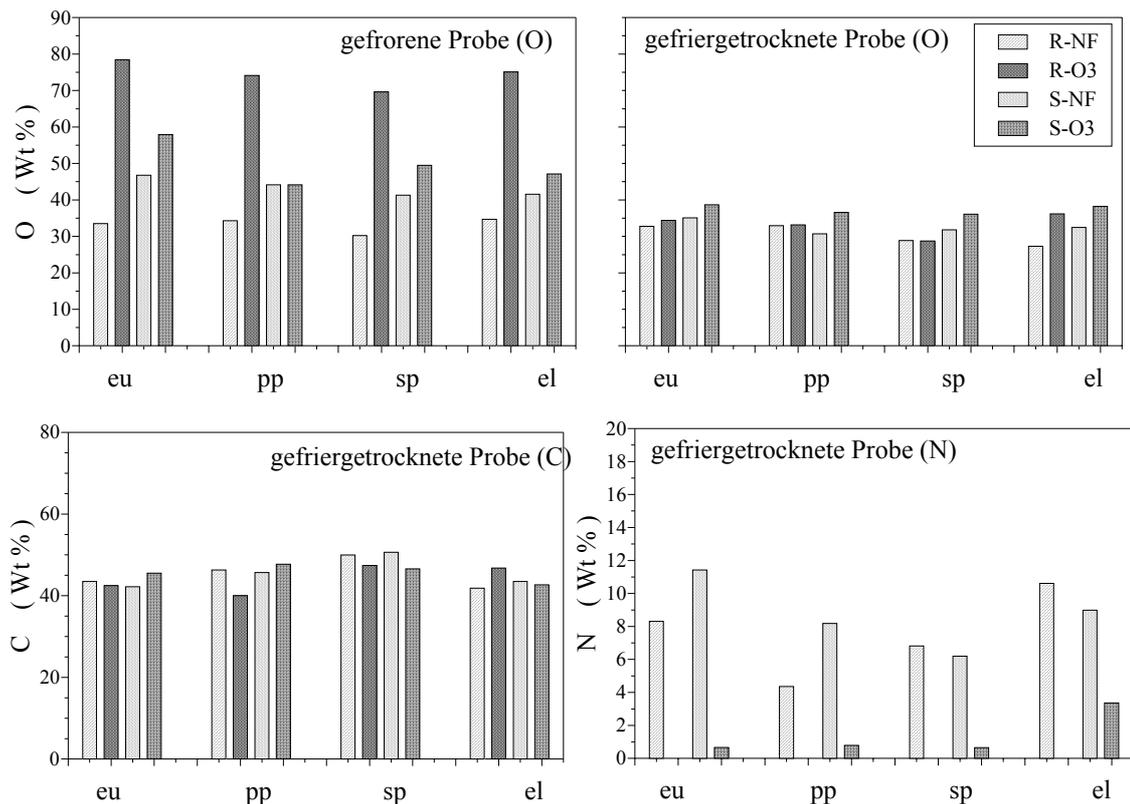


Abb. 70: Gewichtsanteile (in Wt %) der Makroelemente O, C, N in den beiden Kleeklonen

nen

(R-NF und S-NF: Kleeklone in den Kontrollkammern; R-O₃ und S-O₃: Kleeklone in den Ozonansätzen; Wt%: Gewichtsprozentanteile; eu: Obere Epidermis, pp: Palisadenparenchym, sp: Schwammparenchym; el: Untere Epidermis)

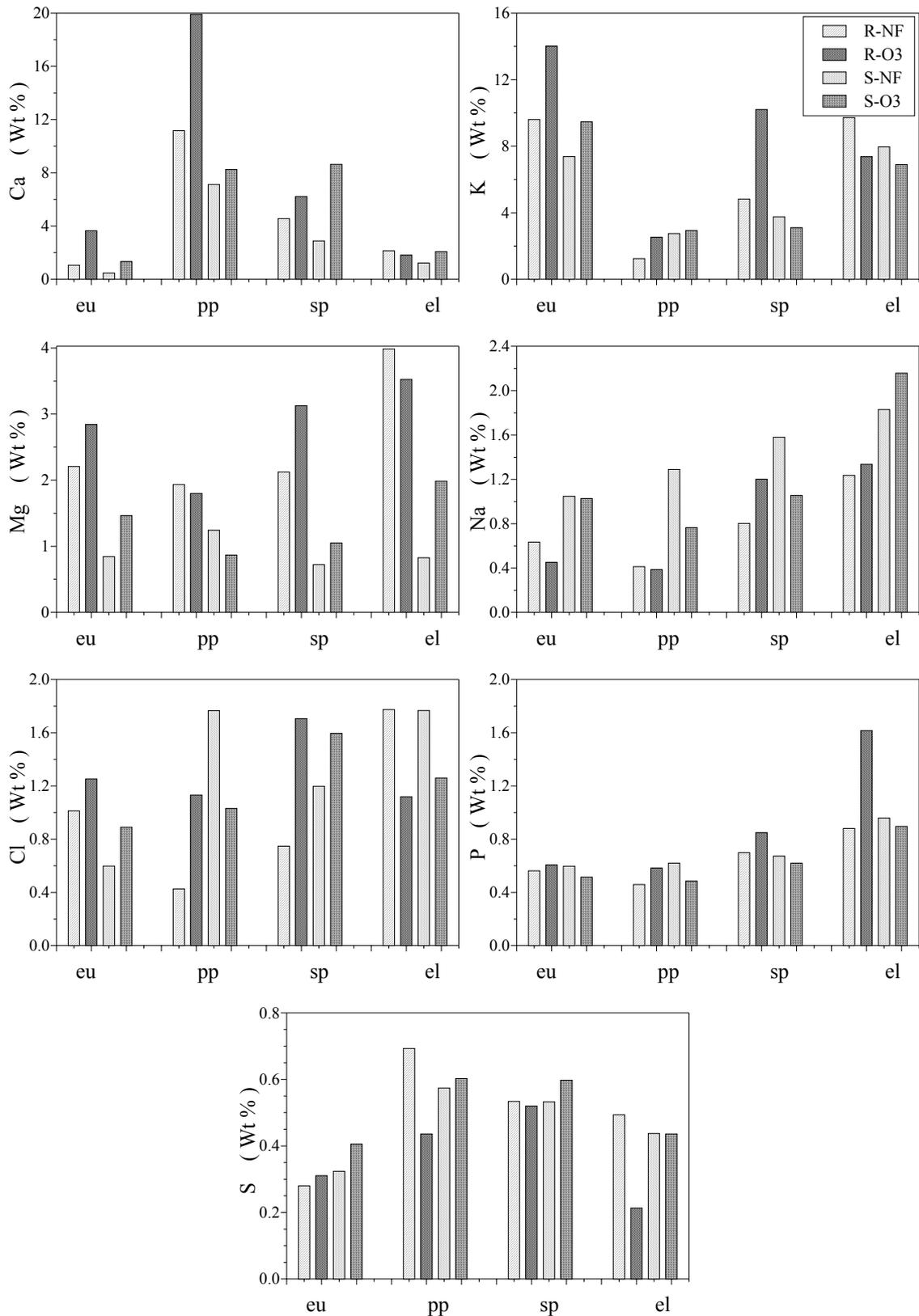


Abb. 71: Gewichtsanteile (in Wt %) der Makro- bzw. Mikroelemente Ca, K, Mg, Na, Cl, P, S, in gefriergetrockneten Proben der beiden Kleeclonen

(R-NF und S-NF: Kleeclone in den Kontrollkammern; R-O₃ und S-O₃: Kleeclone in den Ozonansätzen; Wt%: Gewichtsprozente; eu: Obere Epidermis, pp: Palisadenparenchym, sp: Schwammparenchym; el: Untere Epidermis).

Unabhängig von Klon und Behandlung ist der Kohlenstoff-Anteil (C) relativ konstant (Abb. 70). Im Gegensatz dazu nimmt der Stickstoff-Anteil (N) bei allen Zelltypen beider Klone generell bei Ozonangebot ab. Der Sauerstoff (O_2 , gefrorene Proben) beider Klone steigt erwartungsgemäss bei Ozonangebot in allen Zelltypen an. Allerdings ist nach der Ozoneinwirkung der Anstieg beim resistenten Klon mit bis zu 135 % deutlich höher als beim sensitiven. Bei den gefriergetrockneten Proben wird vorwiegend der Anteil vom Sauerstoff gemessen, der in der organischen Matrix gebunden ist. Der Trend der O_2 -Entwicklung ist in den gefrorenen Proben entgegengesetzt zu dem im gefriergetrockneten. Der behandelte sensitive Klon weist in allen Zellschichten höhere Anteile an Sauerstoff auf als der resistente. Auch beim nicht behandelten sensitiven Klon ist tendenziell eine Zunahme des Sauerstoffs zu verzeichnen.

Die Ozonbehandlung führte auch bei anderen Makro- und Mikroelementen zu mehr oder weniger grosse Veränderungen (Abb. 71):

Die höchsten Calciumkonzentrationen (Ca) wurden im Mesophyll gemessen. Unter Ozoneinwirkung ist eine unverkennbare Zunahme des Calciums sowohl bei den resistenten (eine 77 %ige Zunahme des Calciums im Palisadenparenchym) als auch beim sensitiven Klon (eine 200 %ige Zunahme im Schwammparenchym) zu verzeichnen.

In der unteren und oberen Epidermis wurden generell höhere Kaliumkonzentrationen (K) gemessen als im Mesophyll. Man könnte vermuten, dass ein Transport des Kaliums von der unteren Epidermis zum Mesophyll und der oberen Epidermis stattfindet. Im Schwammparenchym führte die Ozoneinwirkung zu einer Konzentrationsabnahme im sensitiven Klon. Im resistenten wurde eine fast 100 %ige Zunahme festgestellt.

Beim Magnesium (Mg) sind keine eindeutigen Tendenzen zu erkennen. Allerdings weist der resistente Klon in allen Zellschichten eine höhere Magnesiumkonzentration auf, was besonders deutlich beim Schwammparenchym und der unteren Epidermis zu erkennen ist.

Der Natriumanteil (Na) nimmt generell von der oberen Epidermis bis zur unteren Epidermis zu. Bei dem behandelten resistenten Klon bewirkte die Ozoneinwirkung nur kleinere Veränderungen. Es erfolgte u.a. eine Zunahme der Na-Konzentration in den Schwammparenchymzellen. Im Gegensatz zum ozonbehandelten sensitiven Klon erfolgte im Mesophyll eine deutliche Abnahme der Natriumkonzentration.

Bei der Chlorkonzentration (Cl) sind keine eindeutigen Tendenzen zu verzeichnen. Generell kann gesagt werden, dass Ozonbelastung zu einer Zunahme (bis zu 112 % im resistenten Klon) der Chlorkonzentration im Schwammparenchym und zu einer Abnahme (bis zu 34 % im resistenten Klon) in der unteren Epidermis unabhängig von der Sensitivität geführt hat.

Beim Phosphor (P) ist sowohl bei den resistenten Klonen als auch bei den sensitiven (gleichermassen ob sie ozonbehandelt waren oder auch nicht) ein deutlicher Anstieg von der oberen Epidermis bis zur unteren Epidermis zu verzeichnen. Nach Ozoneinwir-

kung ist eine 77 %ige Erhöhung der Phosphorkonzentration bei den resistenten Klonen (R-O₃) zu beobachten. Im Gegensatz dazu bewirkte die Ozonwirkung beim sensitiven Klon fast keine Veränderung.

Die höchsten Schwefelkonzentrationen (S) wurden grundsätzlich in den Mesophyllzellen gemessen. Allerdings bewirkte die Ozonwirkung im Palisadenparenchym und in der unteren Epidermis eine 45 %ige Abnahme beim resistenten Klon.

Stomataanatomie

Mit Hilfe lichtmikroskopischer Untersuchungen der Blattoberfläche wurden Unterschiede sowohl bei der Anzahl als auch bei der Grösse der Schliesszellen beider Kleeclone gefunden (siehe Tabelle 10). Der resistente Klon weist eine grössere Anzahl von Schliesszellen an der Unterseite auf, die allerdings kleiner sind als die des sensitiven Klons. Auf der Oberseite sind Unterschiede zwischen den Klonen nur bei der Grösse der Stomata zu verzeichnen. Der sensitive Kleeclone weist generell sehr grosse Stomata auf. Somit erhöht sich die Expositionsfläche um 19 %. Unter Verwendung folgender mathematischer Formel, die den Umfang einer Ellipse beschreibt, wurde der Umfang der Schliesszellen der beiden Kleeclonen berechnet und in der Tabelle 10 dargestellt.

$$Umfang = \pi * (3/2 * (a + b) - \sqrt{a * b}) \quad (27)$$

a und *b* : grosse bzw. kleine Halbachse der Ellipse

Tabelle 10: Mittelwert der Anzahl pro Fläche und der Länge*Breite der Stomata des resistenten und des sensitiven Klons (n=12)

	Anzahl (n/mm ²)		(L*B in µm)		XUmfang je Stoma (µm)		Gesamtumfang Σ _{st} (mm)	
	R	S	R	S	R	S	R	S
Ober-Seite	274	274	169,5*84,75	197,75*84,75	410,2	462	112,4	126,6
Unter-Seite	196	157	226*141,25	254,25*169,5	584,4	672	114,5	105,5

Die Summe des Umfangs aller Stomata (Σ_{st}) des sensitiven Klones ist auf der Oberseite des Blattes um 12,6 % grösser als beim resistenten Klon. Allerdings weist er auf der Unterseite des Blattes einen um 8 % geringeren Umfang auf, so dass im Endeffekt zwischen den beiden Klonen keine grossen Unterschiede vorliegen.

4. DISKUSSION

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, Fluss-Wirkung-Beziehungen für die Biomasseproduktion und das Auftreten erster sichtbarer Schadsymptome unter Freilandbedingungen zu erarbeiten. Zu diesem Zweck wurde *Trifolium repens* gewählt, weil diese Pflanzenart eine der empfindlichsten Mitteleuropas ist. Damit wird der Überlegung gefolgt, dass, wenn eine der empfindlichsten Arten vor Schädigung geschützt wird, auch der weitgehende Schutz der Vegetation gewährleistet ist. Eingesetzt wurde ein in den Vereinigten Staaten entwickeltes Weissklee-Indikatorsystem, das auf der unterschiedlichen Reaktion des Pflanzenwachstums und der Schadausprägung zweier unterschiedlich sensitiver Genotypen von *Trifolium repens* cv. Regal (NC-Sensitive, NC-Resistant; HEAGLE et al., 1994, 1995, 1996) auf die aufgenommene Ozondosis beruht. Desweiteren wurde in open-top-Kammerexperimenten untersucht, worin die unterschiedliche Sensitivität der beiden Kleeclone besteht.

4.1 Ableitung von O₃-Fluss-Wirkung-Beziehungen

Ozon bewirkt Ernteverluste in Europa und in den USA in einer Größenordnung von 5 - 15 % (MANNING & VON TIEDEMANN, 1995; MAUZERALL & WANG, 2001). Auch sichtbare Schadsymptome können insbesondere im Obst- und Gemüseanbau von ökonomischer Bedeutung sein (<http://www.ncl.ac.uk/airweb/ozone/ozimg.htm>; VELISSARIOU). Schon seit den 1980er Jahren bemüht sich die UN-ECE (United Nations Economic Commission for Europe) *critical levels* (CL) zum Schutz der Vegetation zu definieren, die realistische Gefährdungspotentiale widerspiegeln, um eine potentielle Gefährdung der Umwelt durch Schadstoffeinwirkungen aus der Luft zu bewerten.

In natürlichen Systemen ist die Ermittlung der Zusammenhänge zwischen Ursache und Wirkung insbesondere für Ozon schwierig, da die Konzentration des wirksamen Stoffes im Zielorganismus nicht bestimmbar ist, sondern lediglich die in das betrachtete System fließende Stoffmasse. Jede Wirkung kann deshalb nur als Funktion der in einen bestimmten Zeitraum über die Stomata aufgenommene Ozondosis beschrieben werden (vgl. GRÜNHAGE & JÄGER, 2001):

$$\text{Wirkung} = f(\text{stomatäre Aufnahme}) \quad (28)$$

Bislang wurden alle Ursache-Wirkung-Beziehungen aus Kammerexperimenten, insb. aus Experimenten in *open-top*-Kammer, abgeleitet. Es lässt sich zeigen, dass in derartigen Kammerexperimenten eine direkte Proportionalität zwischen O₃-Begasungskonzentration und stomatärer Aufnahme besteht (GRÜNHAGE et al., 1999).

Critical levels wurden deshalb zunächst definiert als "die Konzentration von Schadgasen in der Atmosphäre, bei deren Überschreitung nach derzeitigem Stand des Wissens direkte Schädigungen an Rezeptoren wie Pflanzen, Ökosystemen oder Materialien auftreten können" (UN-ECE, 1988; UBA, 1996). Auch der derzeitige europäische Zielwert für den Schutz der Vegetation beruht auf Exposition-Wirkung-Beziehungen (Richtlinie 2002/3/EG), die im Rahmen der Arbeiten der UNECE (Working Group on Effects under the Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution) erarbeitet wurden. Der bislang bevorzugte europäische Expositionsindex ist der AOT40-Expositionsindex (*accumulated exposure over a threshold of 40 ppb*) (FUHRER & ACHERMANN, 1994; KARENLÄMPI & SKÄRBY, 1996). Seine Anwendung setzt neben einer optimalen Wasserversorgung die Kenntnis der Ozonkonzentration an der Oberfläche des Bestandes, d.h. an der oberen Grenzfläche der quasi-laminaren Schicht, voraus. Da der AOT40-Expositionsindex nicht das Stomataverhalten des Rezeptors berücksichtigt, führt seine Anwendung zu einer Überschätzung der tatsächlichen O₃-Gefährdung der Vegetation (GRÜNHAGE et al., 1999). Zudem können die sog. Kammereffekte z.B. wie erhöhte Temperatur (GRÜNHAGE et al., 1990; WALLIN et al., 2002), veränderten Lichtintensitäten (FUHRER et al., 1992), Windgeschwindigkeiten (CLARK et al., 2000) die Reaktion des biologischen Rezeptors modifizieren.

Realistische Ursache-Wirkung-Beziehungen können deshalb aus toxikologischer Sicht nur Fluss-Wirkung-Beziehungen sein. Diese Erkenntnis führte 2004 dazu, dass in der o.a. Definition des *critical levels* den Konzentrationen als schadauslösende Größe kumulierte stomatare Flüsse (*cumulative stomatal flux of atmospheric pollutants*) zur Seite gestellt wurden (UNECE, 2004). Die derzeitigen flussorientierten *critical levels* für Kulturpflanzen (Weizen, Kartoffeln) beruhen allerdings auch auf Experimenten in *open-top* Kammern mit Einzelpflanzen, was nicht als bestandesrepräsentativ angesehen werden kann. Für Weizen basiert der flussorientierte Ansatz auf Fluss-Wirkung-Beziehungen von nur fünf Weizensorten aus 4 europäischen Ländern. Da diese Fluss-Ertrag-Beziehungen aus der stomatären Aufnahme des Fahrenblattes abgeleitet wurden, ist es fraglich, ob die Ergebnisse für die ganze Vegetation repräsentativ sind. Wie bereits ausgeführt, sind die Umweltbedingungen in den *open-top* Kammern nicht denen im Freiland vergleichbar. Kammereffekte zeigten sich auch bei dieser Arbeit: In den Kontrollkammern herrschte für beide Kleeclone die gleiche Ozonkonzentration wie im Freiland, da die Luft nicht gefiltert wurde. Trotzdem sind einige Wachstumsparameter unterschiedlich. So ist bei einigen Pflanzen die Anzahl der Blätter sowohl bei dem sensitiven als auch bei dem resistenten Klon unter Freilandbedingungen geringer als in den Kammern, das Trockengewicht der Blätter jedoch größer. Die flussorientierten *critical levels* für Kulturpflanzen basieren zudem auf dem Vorhandensein eines Schwellenwertes: Es wird angenommen, dass unterhalb dieses Schwellenwertes keine ozonbedingten Schädigungen auftreten. Da die Effizienz der Entgiftungsmechanismen abhängig von der

Pflanzenart und ihrer Eigenschaften ist, erscheint ein Abzug eines konstanten Schwellenwertens aus phytotoxikologischer Sicht fraglich (GRÜNHAGE et al., 2004). Zudem berücksichtigt dieser Schwellenwert nicht mögliche "hormetische" Effekte des Ozons auf die Pflanze (*Hormesis*; JÄGER & KRUPA, 2005): Niedrige Ozonaufnahmeraten führen nicht zur einer Biomassereduzierung, sondern es findet eine Stimulierung statt (JÄGER & KRUPA, 2005).

Aus dem bisher angeführten wird offensichtlich, dass realistische Fluss-Wirkung-Beziehungen nur Beziehungen sein können, die unter Freilandbedingungen abgeleitet werden (vgl. GRÜNHAGE & JÄGER, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das "NC-S/NC-R"-Biomasseverhältnis der beiden Klee-Klone zur Ableitung einer Dosis-Ertrag-Beziehung unter Freilandbedingungen benutzt werden. Dieses Weissklee-Indikatorsystem wurde in den Südstaaten der USA (North Carolina) entwickelt und etabliert. Beide Klone reagieren bei höheren Ozonkonzentrationen mit einer Gewichtsreduzierung, wobei der sensitive Klon deutlich stärker reagiert (S/R-Verhältnis < 1 ; HEAGLE et al., 1994; HEAGLE & STEFANSKI, 2000; FUMAGALLI et al., 2003). Unter den im Untersuchungszeitraum vorherrschenden Witterungsbedingungen ließen alle Wachstums- und Biomasseparameter nicht die erwarteten ozonbedingten Veränderungen erkennen: Ozon verursachte keine bedeutende Biomasseverminderung sowohl bei dem resistenten als auch bei dem sensitiven Klon. Auch KÖLLNER & KRAUSE (2002) fanden bei ihren Untersuchungen in Nordrhein-Westfalen keine Biomassereduzierung des sensitiven Klones. CHEVONE et al. (1998) beobachteten ebenfalls eine große Variationsbreite in ihren Biomassedaten der beiden Klone und führen diese auf andere Wachstumsfaktoren wie Temperatur und Windgeschwindigkeit zurück.

Auch die beobachtete Reduktion der Blütenstandanzahl und der Blütenbiomasse korrelierte nicht bei allen Terminen mit der herrschenden O₃-Konzentration. GIMENO et al. (2004) stellte eine Reduktion der Blütenstandbiomasse durch O₃ bei drei mediterranen Kleearten wie *Trifolium cherleri*, *Trifolium subterraneum* und *Trifolium striatum* fest, auch für andere Pflanzen wurde entsprechendes beschrieben (OLLERENSHAW et al., 1999; BERGMANN et al., 1998).

Mögliche Gründe für diese widersprüchlichen Befunde sind die relativ niedrigen O₃-Konzentrationen im Untersuchungszeitraum und die Tatsache, dass der resistente Klon gegen Kälte und Nässe empfindlich reagierte. Auch HEAGLE et al. (1995) beschreiben, dass in Regionen mit mittleren Ozonkonzentrationen und geringeren Temperaturen das S/R-Verhältnis zwischen 1-1,2 lag. KARLSSON et al. (1995) haben bei *Trifolium subterraneum* aufgezeigt, dass die Wachstumsbedingungen und das Ausmaß der Blattschädigung von Jahr zu Jahr variieren kann und von den Ozonepisoden und anderen Klimaparametern abhängig ist. Offensichtlich wächst der resistente Klon unter den kühleren

mitteleuropäischen Klimabedingungen nicht so gut wie in einem "Südstaatenklima" (vgl. POSTIGLIONE et al., 2000).

Folgerichtig musste die Ableitung einer Fluss-Wirkung-Beziehung für das Auftreten sichtbarer Schadsymptome unter Freilandbedingungen für den O₃-empfindlichen Klon NC-S in den Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit rücken.

Hierzu ist es erforderlich den O₃-Austausch zwischen Pflanze und Atmosphäre auf Bestandesebene zu beschreiben. Dazu werden sog. SVAT-Modelle (Soil-Vegetation-Atmosphäre-Transfer) verwendet (vgl. GRÜNHAGE et al., 2000). Das einfachste Modell für die Ableitung kritischer absorbiertes Dosen für O₃ ist das *big-leaf* Modell (siehe 1.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das SVAT-Modell PLATIN (**PL**ant-**AT**mosphere **IN**teraction) eingesetzt, welches zur Bestimmung des Gas- und Energieaustausches zwischen Vegetation und bodennaher Atmosphäre entwickelt wurde (GRÜNHAGE & HAENEL, 1997).

Wie o.a. ist jede Wirkung im pflanzlichen Stoffwechsel eine Funktion der stomatären Aufnahme. Die Stomata reagieren sehr empfindlich auf klimatischen Faktoren wie Lufttemperatur, Lichtintensität, Windgeschwindigkeit und Wasserdampfsättigungsdefizit der Atmosphäre (*vapour pressure deficit*; VPD). Diese Außenfaktoren beeinflussen nicht nur die Aufnahme der Schadstoffe, sondern bestimmen auch deren Wirkung in der Pflanze mit (CAPE et al., 1994). Die stomatäre Leitfähigkeit für O₃ ist über Messungen der Transpiration der Blätter zu bestimmen. Die stomatäre Leitfähigkeit für Wasserdampf wird dabei mit dem Verhältnis der Diffusivitäten von Wasserdampf und Ozon gewichtet. Der Ansatz basiert auf der Annahme, dass die O₃-Moleküle und die H₂O-Moleküle dem gleichen, jedoch entgegengesetzten Wegen folgen (LAISK et al., 1989).

Die stomatäre Leitfähigkeit ist bei allen Modellen der Schlüsselparameter zur Berechnung der Bestandesaufnahme von Ozon. Für die Modellberechnungen ist es sehr wichtig, die maximale stomatäre Leitfähigkeit (g_{max}) zu bestimmen, denn diese ist entscheidend für die Abschätzung der maximalen Öffnungsweite der Stomata. Allerdings hat es sich als sehr schwer erwiesen den "richtigen" g_{max} zu ermitteln (siehe Abschnitt 3.4.1.4). MCLAUGHLIN & TAYLOR (1981) stellten die relative Luftfeuchtigkeit als die wichtigste Regelgröße der Schadstoffaufnahme durch Pflanzen dar: Durch eine Erhöhung der relativen Feuchtigkeit von 35 % auf 75 % wurde die Ozonaufnahme auf das drei- bis vierfache gesteigert. Nach KELLOMÄKI & WANG (1997) wird durch Ozon die maximale stomatären Leitfähigkeit signifikant reduziert und die Sensitivität der stomatären Leitfähigkeit gegenüber VPD-Änderungen erniedrigt. Andere Autoren behaupten, dass die Stomata nicht direkt auf die relative Feuchte reagieren, sondern auf die geänderte Transpiration (MOTT & PARKHURST, 1991; LEUNING et al., 1995; MONTEITH, 1995; DEWAR, 1995).

Der Einfluss von Strahlungsintensität, Lufttemperatur und Wasserdampfsättigungsdefizit der Atmosphäre auf das Spaltöffnungsverhalten der O₃-empfindlichen Kleepflanzen (Abb. 30-32) konnte mit einem R² von 0,464 wiedergespiegelt werden. Die maximale Leitfähigkeit g_{max} wurde mit 0,01878 m/s (=765 mmol/(m²·s)) abgeschätzt. Dieser Wert kommt dem bei MILLS et al. (2002) beschrieben von 780 mmol/(m²·s) recht nahe. In MILLS et al. (2002) werden modellierte und gemessene stomatäre Leitfähigkeiten von zwei anderen Standorten in Europa (in Trier-D und Rom-I) präsentiert. Die Datensätze zeigen allerdings ein deutlich geringes Bestimmtheitsmass (Trier: R² = 0,1444, Rom: R² = 0,2781).

Die stomatäre Aufnahme des Bestandes wird durch das stomatäre Verhalten des einzelnen Blattes und den Blattflächenindex (*LAI*) bestimmt. Aus diesem Grund ist die LAI-Entwicklung ein wichtiger Parameter für die Modellierung der Evapotranspiration (RITCHIE & BURNETT, 1971; BRUN et al., 1972; AL-KAISI et al., 1989), der Bestandes-Photosynthese (WALL & KANEMASU, 1990) und der *pollutant absorbed dose*. So zeigten z.B. STEDUTO & HSIAO (1998) bei Maispflanzen, dass der Blattflächenindex einer der wichtigsten Faktoren ist, der die Wasser-Verhältnisse in einem Feld kontrolliert. DAVISON et al. (2003) beschreiben bei *Rudbeckia laciniata* L. (Sonnenhut) eine Verminderung des Ozons um 16 % pro LAI-Einheit. FINKELSTEIN (2001) zeigte Unterschiede der Ozondepositions geschwindigkeit in Abhängigkeit vom LAI in verschiedenen Vegetationstypen. Es wurde beobachtet, dass die Ozondepositions geschwindigkeit um 15 % pro LAI-Einheit anstieg.

Die Beziehung der LAI-Entwicklung zu den Expositionstagen konnte mit Hilfe einer modifizierten "Chapman" Funktion (sigmoide Funktion, drei Parameter) gut beschrieben werden. Nicht nur in den einzelnen Expositionen, sondern auch bei den zusammengeführten Daten aus verschiedenen Jahren beweist das R², dass die abgeschätzten Daten den gemessenen Daten gut angepasst werden konnten (R²=0,91).

Der stomatäre Bestandeswiderstand wurde, wie im Abschnitt 3.4.1.4 beschrieben, durch ein *upscaling* des stomatären Blattwiderstandes unter Berücksichtigung des LAI berechnet. Auch bei anderen Versuchreihen wurde versucht bei bekannten LAI vom Blatt zum Bestand hochzukalieren (BADLOCHI et al., 1987; KELLIHER et al., 1995; GRÜNHAGE et al., 2000). Allerdings wird mit dieser Methode angenommen, dass alle Blätter zu einem bestimmten Zeitpunkt das gleiche Potential zum Gasaustausch besitzen, was allerdings nicht stimmt (JARVIS, 1995). So wird beim Klee ein Blätterdach mit größeren Blättern gebildet, wobei sich die Mehrheit der Blätter unterhalb dieser Dachblätter befindet. Diese Blätter sind kleiner und besitzen durch die Überlagerung mehrerer Blattschichten ein anderes photosynthetisches Potential (Schattenblätter). Es ist offensichtlich, dass mit dem *upscaling* einige Fehlerquellen verbunden sein können. In PLATIN wird das unterschiedliche Verhalten von Sonnen- und Schattenblätter durch

eine sog. β -Funktion berücksichtigt, die die Bestandesentwicklung und die Lichtverteilung im Bestand widerspiegelt.

Die O_3 -Aufnahme wird neben dem stomatären Verhalten auf Blattebene und der Bestandesentwicklung auch von den Austauschigenschaften der Atmosphäre bestimmt. Die Transporteigenschaften der Atmosphäre für Spurengase ist abhängig von der Rauigkeit des Bestandes, die in der Regel als eine Funktion der Bestandeshöhe parameterisiert wird. Die Entwicklung der Höhe der Kleepflanzen konnte mit Hilfe einer linearen Beziehung gut beschrieben. Die gemessenen Daten wurden auch hier erfolgreich angepasst ($R^2=0,81$).

Da der Einfluss von Ozon auf den sensitiven Kleeclon nur in Gefäßen und nicht im Feldanbau untersucht werden konnte, war es unumgänglich zu prüfen, ob das Stomataverhalten des Klons auf Gefäßebene im Modell richtig wiedergespiegelt wird. Dies erfolgte durch Messungen des Wasserverbrauchs der Gefäße (Evapotranspiration). Zu berücksichtigen war hierbei, dass die Kleegefäße in Bestandeshöhe eines Grünlandökosystems exponiert wurden. Im Gegensatz zu den optimal mit Wasser versorgten Kleegefäßen ist das Grünland den natürlichen Wasserhaushaltsschwankungen (Niederschlagsperioden, Trockenperioden) ausgesetzt. Exponiert man kleine, gut bewässerte Gefäße in einer in der Regel trockeneren Umgebung, so muss der sog. Oaseneffekt in der Modellparameterisierung berücksichtigt werden: Die Evapotranspiration einer kleinen feuchten Fläche (Kleegefäß) in einer trockener Umgebung (Grünland ohne Bewässerung) ist höher als bei einer ausgedehnten feuchten Fläche. Die Zunahme der Evapotranspiration ist dabei umgekehrt proportional der Ausdehnung der feuchten Fläche. Dies hat zur Folge, dass die Evapotranspiration beziehungsweise der Gasaustausch des Klees auf Gefäßebene größer ist als auf Feldebene. Wie Abb. 34-35 und 36-38 zeigen, konnte für unbewachsene Gefäße die Evaporationsraten und für Kleegefäße die Evapotranspirationsraten hinreichend genau modelliert werden. So liegen die modellierten Werte weitgehend in dem Bereich der Standardabweichung der gemessenen Daten. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass die Parametrisierung des Stomataverhalten die Realität angemessen widerspiegelt und damit auch - unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Diffusivitäten von Wasserdampf und Ozon - die stomatäre O_3 -Aufnahme abgeschätzt werden kann.

Allerdings ergibt sich der Ozonfluss auf Bestandesebene a) aus der stomatären Aufnahme (Fluss durch die Stomata und die Cuticula) und b) aus der nicht-stomatären Deposition (Deposition an externe Pflanzenoberflächen und Boden) (GRÜNHAGE et al., 2004). Da die cuticuläre Aufnahme um einen Faktor von 10000 geringer ist als die stomatäre Aufnahme (KERSTIENS & LENDZIAN, 1989), ist sie vernachlässigbar. Damit gilt:

$$F_{\text{total}}(O_3) \cong F_{\text{stomatäre}}(O_3) + F_{\text{nicht-stomatäre}}(O_3) \quad (29)$$

Eine Aufteilung des O₃-Austausches zwischen bodennaher Atmosphäre und Vegetation bedarf neben einer "korrekten" Parameterisierung der stomatären Aufnahme auch eine entsprechend "korrekte" für die nicht-stomatäre Deposition. Da die den O₃-Austausch beschreibenden Transportwiderstände parallel geschaltet sind, beeinflussen sich beide Depositionswege gegenseitig. Mit anderen Worten, eine Parameterisierung für die nicht-stomatäre Deposition, die diese unterschätzt, führt selbst bei einer korrekten Parameterisierung des Stomataverhaltens auf Bestandesebene zu einer Überschätzung der stomatären Aufnahme (vgl. GRÜNHAGE et al., 2004).

Für die Ableitung einer Fluss-Wirkung-Beziehung für das Auftreten sichtbarer Schadsymptome wurden im Untersuchungszeitraum insgesamt 89 Bonituren durchgeführt. Dabei konnte an 29 Boniturterminen Schäden diagnostiziert werden. In zahlreichen Experimenten wurden an den Pflanzen verschiedene symptomatologische Veränderungen durch Ozonexposition beobachtet: Dazu zählen Schädigungen des Blattes wie Chlorosen oder Nekrosen (SANDELIUS et al., 1995; BENDER & WEIGEL, 1995; BRÄUNING, 2002; TEMMERMAN et al., 2002). Die typischen Schadsymptome variieren von Pflanzenart zu Pflanzenart: Bei *Phaseolus vulgaris* zeigen sich typische Ozonschäden als bronzefarbene Verfärbungen und Chlorosen (BRÄUNING, 2002), bei *Nicotiana tabacum* sind es silbrig bis weiß glänzende Flecken und bei *Trifolium arvense* weiße punktförmige Flecken. Unter Freilandbedingungen konnten bei dem sensitiven Klon punktförmige Chlorosen und später Nekrosen beobachtet werden (Der resistente Klon zeigte keinerlei Beeinflussung durch die Ozoneinwirkung, was auch bei POSTIGLIONE et al. (2000) der Fall war). Da die beobachteten Symptome bei unterschiedlichen Blattflächenindizes auftraten, koinzidieren diese automatisch - auch bei sonst gleichen Bedingungen (u.a. Ozonkonzentration, Transporteigenschaften der Atmosphäre, stomatäres Verhalten) - mit unterschiedlich hohen stomatären Aufnahmen. Deshalb wurde die aufgenommene O₃-Dosis (PAD) nach GRÜNHAGE et al. (1999) auf eine effektive LAI-Einheit bezogen. In Abbildung 72 sind die stomatären O₃-Aufnahmen bezogen auf eine effektive LAI-Einheit und aufsummiert über 5 aufeinanderfolgende Tage für die 29 Boniturtermine, an denen Schadsymptome beobachtet wurden, gegen die Zeit aufgetragen.

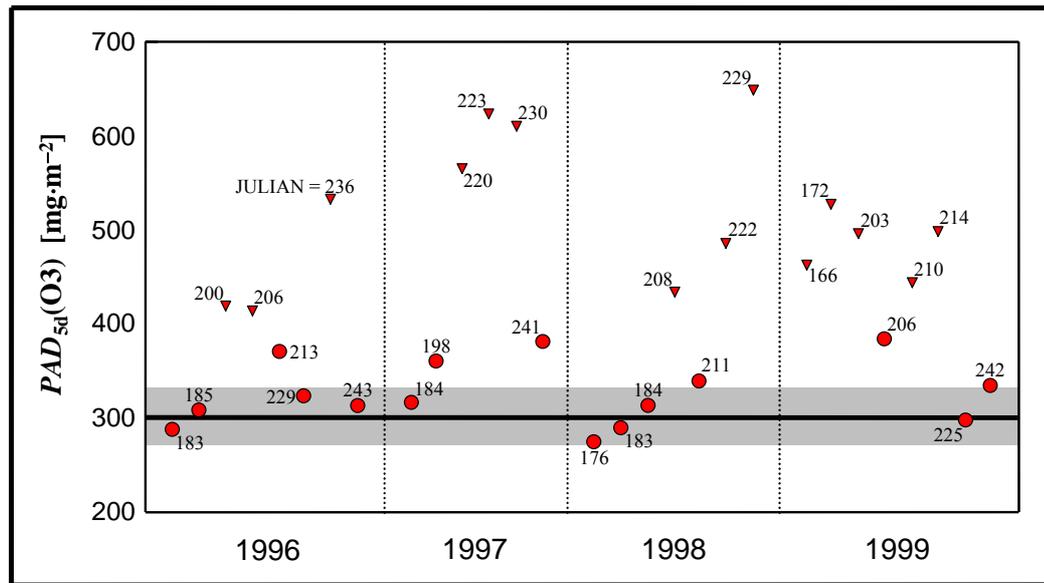


Abb. 72: Stomatäre O₃-Aufnahme (PAD) bezogen auf eine effektive LAI Einheit und aufsummiert über fünf aufeinanderfolgende Tage während der Tageslichtstunden vs. Jahrestage mit eindeutigen Schadsymptomen am NC-S-Kleeklon (●): Zeitperioden mit niedriger bis mittlerer O₃-Belastung; (▼): Zeitperioden mit mittlerer bis hoher O₃-Belastung)

Hervorzuheben ist, dass für das Auftreten einer Schädigung nicht nur die in einem bestimmten Zeitpunkt aufgenommene Ozondosis verantwortlich ist. Eine wichtige Rolle spielt auch das "Absorptionsmuster". Es ist wahrscheinlich, dass bei gleichen absorbierten Dosen die Blattschädigung um so mehr ansteigt in je kürzerer Zeit die Schadstoffe über die Stomata aufgenommen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde jeweils die aufgenommene Dosis von 5 aufeinanderfolgenden Tagen aufsummiert. Es ist also möglich, dass bei einigen Terminen die Gesamt-Dosis über die 5 Tagen verteilt war und bei anderen diese Dosis z.B. nur in den ersten 2 Tagen aufgenommen wurde. Man würde erwarten, dass im zweiten Fall mit größerer Wahrscheinlichkeit eine Schädigung auftritt. Festgestellt werden kann, dass Schädigungen sowohl in Perioden mit geringer bis mittlerer Ozonbelastung (●), als auch in Perioden mit mittlerer bis hoher O₃-Belastung (▼) auftraten. Da es aus Zeitgründen nicht möglich war jeden Tag zu bonitieren, kann man bei den mittleren bis hohen Belastungssituationen nicht genau zuordnen, welche O₃-Aufnahme mindestens für die Schadausprägung vorhanden sein musste. So wurden zur Ableitung eines Schwellenwertes für das Auftreten sichtbarer Schadsymptome die Ergebnisse der Perioden mit geringe bis mittlerer O₃-Belastung herangezogen. Daraus resultiert eine kritische stomatäre O₃-Aufnahme $PAD(O_3)$ von $300 \pm 30 \text{ mg O}_3/\text{m}^2$ Grundfläche bezogen auf eine effektive LAI -Einheit und aufsummiert über 5 aufeinanderfolgende Tagen während der Tageslichtstunden. Das graue

Band (die Spanne) berücksichtigt die Streuung und die statistische Unsicherheit in den Datensätzen.

Die Ableitung dieses kritischen Wertes für die Auslösung sichtbarer Schadsymptome wurde - wie bereits ausgeführt - unter Berücksichtigung aller Einflussfaktoren auf das O₃-Depositionsgeschehen abgeleitet. In der Literatur finden sich allerdings auch andere Ansätze, bei denen die stomatäre Leitfähigkeit lediglich mit der in einer bestimmten Höhe gemessenen Ozonkonzentration multipliziert und so die stomatäre Ozonaufnahme der Pflanze kalkuliert wird (EMBERSON et al., 2000; BERMEJO et al., 2002; GRULKE et al., 2002; MILLS et al., 2002). Dieser Ansatz weicht sehr ab von den Gesetzen der Physik/Mikrometeorologie, da die Einflüsse von R_{ah} , $R_{b(O_3)}$ und $R_{\text{nicht-stomatär}(O_3)}$ auf die stomatäre Ozonaufnahme nicht berücksichtigt werden, was in einer signifikanten Überschätzung der Ozonaufnahme resultiert (vgl. Abb.3 in GRÜNHAGE et al. 2002). Darum sind Fluss-Wirkung-Beziehungen, die auf diesem Konzept basieren, fraglich.

Allerdings muss die hier abgeleitete kritische kumulierte stomatäre O₃-Aufnahme PAD(O₃) von 300 mg O₃/m² Grundfläche als vorläufig anzusehen werden, weil - wie o.a. - die stomatäre Aufnahme von der Genauigkeit der Berechnung der nicht-stomatären Deposition abhängig ist. Der Widerstand für die Deposition auf externe Pflanzenoberflächen wird in der Regel - wie auch hier - durch einen konstanten Wert parameterisiert. Aus neueren Untersuchungen geht hervor, dass die nicht-stomatäre Deposition mehr als 50 % des gesamten O₃-Flusses ausmachen kann (z.B. FOWLER et al. 2001; ALTIMIR et al. 2004) und der Widerstand für die nicht-stomatäre Deposition auf Pflanzenoberflächen nicht als konstant angesetzt werden kann. Die Ableitung einer allgemeingültigen kritischen PAD(O₃) erfordert demnach noch die Ableitung einer geeigneten Parameterisierung für diesen Widerstand über mikrometeorologische Flussmessungen über einem Kleefeld. Desweiteren sind Validierungsexperimente an weiteren Standorten in Europa erforderlich.

4.2 Untersuchungen zur O₃ Sensitivität zweier Klone von *Trifolium repens* cv. Regal

Welche Mechanismen der unterschiedlichen O₃-Sensitivität zugrunde liegen ist nicht nur im vorliegenden Fall der zwei Klee-Klone noch nicht geklärt. Unterschiede zwischen der stomatären Leitfähigkeit der beiden Klonen würden auf ungleiche O₃-Aufnahmeraten hinweisen. Eine höhere stomatäre O₃-Aufnahme des sensitiven Klones könnte dann dessen höhere O₃-Empfindlichkeit erklären. Allerdings wurden keine nen-

nenswerten Unterschiede der Leitfähigkeit zwischen den beiden Klonen gefunden, was durch die Untersuchungen von D'HAESE et al. (2005) bestätigt wird.

Eine weitere Ursache unterschiedlicher Sensitivitäten ist auf Stoffwechselebene zu suchen. In den letzten Jahren ist eine Vielzahl von Antioxidantien in den verschiedenen Zellkompartimenten identifiziert worden (LANGEBARTELS et al., 2002). Die Konzentration der verschiedenen Antioxidantien in einer Pflanzenzelle spielt eine große Rolle bei Reparatur- bzw. Kompensationsmechanismen der Pflanze gegen Schadstoffe. Sowohl Zunahmen als auch Abnahmen der Antioxidantien-Konzentrationen wurden unter Ozon beschrieben. Eine herausragende Rolle dabei spielt das Ascorbat (PLÖCHL et al., 2000; MOLDAU & BICHELE, 2002). Die Besonderheit des Ascorbats ist seine Funktion als *scavenger* (Radikalfänger) gegen ROS, den Folgeprodukten der Ozonreaktion im wässrigen Milieu (LUWE, 1996; LYONS et al., 1999). Ozon selbst reagiert sehr schnell mit reduziertem Ascorbat, welches dabei oxidiert wird (URBACH et al. 1989; VAN HOVE et al. 2001). Die erste Barriere zur Ozondetoxifikation ist der Apoplast. Aus diesem Grund ist seine Untersuchung im Kontext der Ozonresistenz von besonderem Interesse (KOLLIST et al. 2000; LYONS et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb sowohl im Gesamtblatt als auch in der Apoplastenflüssigkeit die Ascorbatkonzentration (G-AsA, AsA) und die Aktivität der Ascorbatperoxidase (APO) untersucht. Desweiteren wurde die Aktivität der unspezifischen Peroxidasen (POX) erfasst. Erwartungsgemäß ist die POX-Aktivität bei beiden Klonen sowohl in der Gesamtblattfraktion als auch in der Apoplastenflüssigkeit erhöht. Die Peroxidase-Aktivität im resistenten Klon erhöht sich nur wenig (45 % Gesamtblattfraktion), während beim sensitiven Klon ein deutlicher Anstieg (178 % Gesamtblattfraktion; 77 % Apoplast) gemessen wurde. Der Anstieg der unspezifischen Peroxidasen wird als universeller Stressfaktor gesehen (WEIGEL et al., 1989; MANDERSCHIED & JÄGER, 1991; BURKEY et al., 2000). Das heißt in unseren Fall, dass die mit Ozon behandelte sensitive Pflanze sich unter erhöhten Stressbedingungen befindet, was mit der Symptomatologie im Einklang steht. Die Aktivitätssteigerung erfolgte im Apoplasten erst gegen Ende der Exposition, womit nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sich hierbei um eine Alterungserscheinung handeln könnte. Untersuchungen von RANIERI et al. (1996) zeigten auch eine Erhöhung der POX-Aktivität bei zwei unterschiedlichen ozontoleranten Pappel-Klonen und Versuche mit *Phaseolus vulgaris* (BRÄUNING, 2002; BURKEY et al., 2000; DIOP et al., 1997) zeigten in Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen eine stärkere Erhöhung der Peroxidase-Aktivitäten der ozonsensitiven Variante.

Tabelle 11: Veränderungen der Aktivität der unspezifischen Peroxidasen (POX), der Konzentration am gesamt (G-AsA) und reduziertem Ascorbat (AsA) und der Ascorbatperoxidase-Aktivität (APO) und in der Gesamtblattfraktion und im Apoplasten nach Ozoneinwirkung

(0: Keine Änderung, +: geringe Erhöhung, +++: starke Erhöhung)

	POX	G-AsA	AsA	Redoxstatus	APO
Gesamtblatt					
R-Klon	+	0	0	0	+
S-Klon	+++	+	+	0	++
Apoplast					
R-Klon	0	+	+	+	+
S-Klon	+++	++	++	+	+

Eine Behandlung der Pflanzen mit Ozon führte in der Gesamtblattfraktion zu minimalen Veränderungen in der Gesamtascorbatkonzentration (G-AsA). ZÖRB (1994) fand dass die sensitiven Pflanzen von *Trifolium repens* im Vergleich zu den toleranten Pflanzen etwa 40 % höhere Gesamtascorbatmengen aufweisen. Solche deutlichen Unterschiede zeigten sich bei den Messungen der Apoplastenflüssigkeit. Der mit Ozon behandelte sensitive Klon wies kontinuierlich den höchsten Wert an Gesamtascorbat auf. D'HAESE et al. (2005) zeigt für *Trifolium repens*, dass während der Ozonexposition die apoplastische Ascorbatkonzentration des sensitiven Klons um 72 % anstieg, während die des resistenten Klons konstant blieb.

Entsprechende Ergebnisse zeigen sich für das reduzierte Ascorbat (AsA). Im sensitiven Klon stieg der Anteil des reduzierten Ascorbats im Laufe der Ozonexposition an. Allerdings sind diese Änderungen in der Gesamtblattfraktion nur minimal, im Apoplasten jedoch deutlich ausgeprägt. Von LUWE & HEBER (1995) und KOLLIST et al. (2000) wurden diurnale Schwankungen sowohl von reduziertem als auch von oxidiertem Ascorbat beobachtet. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen sind solche diurnalen Schwankungen nicht gänzlich auszuschliessen, da aufgrund des Probenumfangs sowie des Versuchsablaufes zeitliche Verschiebungen der Probennahmen nicht immer auszuschliessen waren.

Hinsichtlich des Redox-Status ($\text{Ascorbat}_{\text{red}}/\text{Ascorbat}_{\text{ges}}$) ist deutlich zu erkennen, dass sowohl in der Gesamtblattfraktion als auch im Apoplasten unter Ozoneinwirkung bei beiden Klonen entgegen der Erwartungen mehr Ascorbat in der reduzierten Form vorliegt. Der Redox-Status bestimmt sowohl die Funktions- als auch die Reaktionsfähigkeit von Ascorbat. Das Ozon reagiert mit der reduzierten Form des Moleküls und in der

Folge sollte ein Anstieg der oxidierten Form zu beobachten sein (POLLE et al., 1995). Im vorliegenden Versuchsansatz lagen unter "Normalbedingungen" 77 % (resistenter Klon) und 67 % (sensitiver Klon) des gesamten Ascorbats in der reduzierten Form vor, was im Vergleich zu anderen Untersuchungen, bei denen fast 96 % reduziert vorliegen (LAW et al., 1983), relativ niedrig war. Nach Ozonwirkung war im R-Klon 80 % und im S-Klon 82 % reduziert. Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich des Redox-Status der beiden Klone wurden auch von D'HAESE et al. (2005) beobachtet. Schon vor der Ozonexposition wies der sensitive Klon einen zwei- bis dreimal höheren Redox-Status im Vergleich zu den resistenten auf. Allerdings blieb dieser Redox-Status während der Exposition konstant. Laut PIGNOCCHI & FOYER (2003) spielt Ascorbat eine wichtige Rolle bei der Homöostase des intrazellulären Redox-Status und kann damit auch als Signalmolekül fungieren. D'HAESE et al. (2005) vermutet, dass durch den gestörten Redox-Status die Signaltransduktionskette quer durch die Plasmamembran gefährdet wird, was zur möglichen erhöhten Sensitivität des NC-S Klons führt.

Die Ascorbatperoxidase-Aktivität steigt bei beiden Klonen unter Ozonwirkung an. Entgegen den Erwartungen war dieser Anstieg beim sensitiven Klon stärker ausgeprägt. Die Messungen im Apoplasten zeigten diese Unterschiede nicht so deutlich.

Hinsichtlich der Beurteilung der Ozontoleranz von *Trifolium repens* kann das Ascorbat / APO-System offensichtlich nicht herangezogen werden. Auch andere Untersuchungen zeigten, dass eine Ozontoleranz nicht immer mit der Ascorbatkonzentration korreliert (RANIERI et al., 1999; VAN HOVE et al., 2001; D'HAESE et al., 2005). Es wird angenommen, dass erhöhte Ascorbatkonzentrationen als eine generelle Stressreaktion gesehen werden müsse und nicht als eine Entgiftungsreaktion gegen Ozon (VAN HOVE et al., 2001). BRÄUNING et al. (2005) zeigten, dass zur Einschätzung der O₃-Toleranz einer Pflanze das gesamte antioxidative System untersucht werden muß und keine einzelnen Parametern.

TANG et al. (1999) fanden bei *Trifolium repens* eine Gruppe von Proteinen mit niedrigem Molekulargewicht, welche nach einer 3-tägigen Ozonexposition in den toleranten Klon akkumulierten. Diese Polypeptide waren in den Kontrollpflanzen nicht zu identifizieren, was zu der Vermutung führt, dass diese durch Ozon (Stress) induziert werden und eine wichtige Rolle bei einer eventuellen Toleranz von Pflanzen gegenüber Ozon spielen. D'HAESE et al. (2005) fanden im Apoplasten der unbehandelten resistenten Klone einen höheren Redox-Status des Homoglutathions (hGSH). Man glaubt, dass das hGSH den gleichen antioxidativen Mechanismus wie das GSH aufweist (KLAPHECK, 1988; MORAN et al., 2000) und damit als „Ersatz“ zu GSH fungiert.

Eventuell könnte auch beim Klee ein sogenannter programmierter Zelltod vorliegen wie auch PASQUALINI et al. (2003) bei der sensitiven Tabakvariante cv. Bel W3 festgestellt hat. Sollte dies der Fall sein, so ist ein eventueller Widerstand gegen das Ozon nicht

mehr relevant, vielmehr versucht die Pflanze, so schnell wie möglich alle organischen Verbindungen aus dem Blatt zu transportieren, um diese anderweitig nutzen zu können. So wird ein zeitlich begrenztes Überleben der Pflanze gewährleistet. Die Initiierung dieses programmierten Zelltodes erfolgt als Reaktion auf die ROS, die vom Ozon generiert werden. Ozon setzt Signaltransduktionsketten in Gang, ähnlich denen, die durch Pathogene induziert werden (LANGEBARTELS et al., 2002).

Deutliche Unterschiede in der Blattanatomie konnten mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie zwischen den Kleeklonen nachgewiesen werden. Der Anteil des Palisadenparenchyms war beim resistenten Klon grösser als beim sensitiven. Die sensitive Variante hatte außerdem auffällig viele (eher untypisch) rundliche Palisadenparenchymzellen sowie ein stärker ausgeprägtes Schwammparenchym und damit verbunden einen deutlich grösseren Interzellularraum (siehe 3.5.2; Abb. 62). In Übereinstimmung mit der vorliegenden Untersuchung wies FERDINAND et al. (2000) nach, dass der O₃-sensitive Genotyp von *Prunus serotina* eine signifikant dünnere Palisadenschicht, ein ausge dehntes Schwammparenchym, einen höheren Anteil des Schwammparenchyms am Mesophyll und eine geringfügig höhere Blattdicke aufweist. OKSANEN et al. (2001) zeigte eine ozonbedingte Abnahme der Blattdicke bei einem ozonsensitiven im Vergleich zu einem toleranten Zitterpappelklon (*Populus tremuloides*). Zusätzlich wurde bei dem sensitiven *Populus*-klon eine dünnere Zellwand, eine reduzierte Oberfläche der Mesophyllzellen und ein kleineres Interzellularvolumen ausgebildet.

Die Größe der Interzellularen bestimmt die Aufnahmekapazität für Ozon, das über die Stomata in den Interzellularraum gelangt (CAPE & UNSWORTH, 1998). Je größer die Interzellulare desto größer die O₃ Aufnahme und desto größer die Angriffsfläche für Ozon an frei zugänglichen Zellwandflächen. Eventuell nimmt der Diffusionswiderstand für Ozon in den Wänden der Interzellulare ab, was zur Folge hätte, dass eine größere Ozondosis aufgenommen werden kann. Eine derart erhöhte Aufnahme von Ozon könnte bei der sensitiven Variante die Ursache für das Auftreten größerer Schäden sein (Abb. 64 & 66). In der Literatur wird der Zusammenhang von ozonsensitiven Blättern und Interzellularraumvolumen häufig angeführt (LEE et al., 1999; FERDINAND et al., 2000; GRAVANO et al., 2003). Ein großes Interzellularvolumen ist charakteristisch für sehr leistungsfähige Blätter, die bevorzugt Photosynthese-Enzyme produzieren und gleichzeitig weniger Schutzmechanismen für die Zellwände und assoziierte Strukturen (u. a. Plasmalemma) aufbauen (WILSON et al., 1999).

Nachdem das Ozon die Zellwand passiert hat, greift es zunächst das Plasmalemma an (TOKARSKA-SCHLATTNER et al., 1997). Die damit verbundene Änderung der Membranpermeabilität und -viskosität führt zu Funktionsstörungen verschiedener Transportproteine. Der pflanzliche Stoffwechsel wird anschließend vielseitig beeinträchtigt, und es kommt zu Fehlfunktionen und letztendlich zum Zelltod. Untersuchungen an *Fraxinus*

excelsior und *Fagus sylvatica* haben gezeigt, dass die ozonbegasteten Varianten kollabierte Zellen und degenerierte Chloroplasten aufwiesen (KIVIMAENPAA et al., 2004). Der Degenerationsprozess begann an den Mesophyllzellen und breitete sich später bis zu den Schließzellen aus. Der sensitive Kleeklon (siehe Abb. 66) wies unförmige (offensichtlich nicht-turgeszente) und anscheinend hochpermeable (Wasser und Ionen verlierende) Schwammparenchymzellen auf, die apoptotischen Zellen (vorprogrammierter Zelltod) ähneln (LANGEBARTELS et al., 2002; PASQUALINI et al., 2003). Diese Hypothese wurde auch durch die Ergebnisse der EDX-Analytik bekräftigt (Abb. 71). (Abnahme von Kalium und Natrium im Schwammparenchym des sensitiven Klones, Zunahme beider Elemente beim resistenten; Einzelheiten siehe unten).

Weiterhin wurde bei den Schwammparenchymzellen des sensitiven Klones eine starke elektrische Aufladung der Chloroplasten bei Elektronenbeschuss im Rasterelektronenmikroskop festgestellt (Abb. 64). Eine solche starke Aufladung der Chloroplasten wurde auch in anderen Arbeiten beschrieben (GRAVANO et al., 2003). Dieser elektronenoptische Kontrast könnte auch auf eine Verminderung bzw. Schädigung des Chlorophylls hinweisen, da nach Ozoneinwirkung eine Verminderung des Chlorophyllgehalts festgestellt werden konnte (SANDELIUS et al., 1995; WALLIN et al., 2002). Dieses Phänomen der Aufladung wird als Hinweis für eine niedrige Elektronenleitfähigkeit in der unmittelbaren Umgebung des Chloroplasten betrachtet wie sie u.a. nach "Ion-leakage" erfolgt (Abb. 64). Ein erhöhter Ionenverlust assoziiert mit einer geschädigten Membranzintegrität des Plasmalemmas als Folge erhöhter O₃-Konzentration wurde auch von CALATAYUD et al. (2002) beobachtet.

Generell beeinflusst Ozon den gesamten Mineralstoffhaushalt der Pflanzen (LUCAS et al., 1993; FANGMEIER et al., 2002; MCAINSH et al., 2002; SIEFERMANN-HARMS et al., 2005). Ozon führte in allen Zelltypen des resistenten Klons (R-O₃) zu einer Abnahme des Kohlenstoffgehalts (C) (gefriergetrocknete Probe) und zu einer Erhöhung des Sauerstoffgehalts (O) (gefrorene Probe) (Abb. 70). Im sensitiven Klon gab es kaum Änderungen. Für diese quantitativen Unterschiede zwischen den Klonen ist folgende Erklärung möglich: Es ist möglich, dass der resistente Klon effizienter die Sauerstoffradikale (FOYER & HALLIWELL, 1976) entgiftet. Dabei könnte der Sauerstoff in Form von Wasser gebunden werden, was zu einer Erhöhung des Sauerstoffgehaltes führen kann. Bei dem sensitiven Klon könnte eine Oxidation von Kohlenstoffverbindungen stattfinden was zur Einlagerung von Sauerstoff in der Trockenmasse führt (siehe Abb. 70). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte generell (d.h. in allen Zelltypen beider Klone) eine hochsignifikante Abnahme des Stickstoffgehaltes (N) nachgewiesen werden (Abb. 70). Untersuchungen an Nadeln von *Picea abies* zeigten ebenfalls eine Verminderung der Gesamtstickstoffkonzentration (PFIRRMANN et al., 1996). Dieser Effekt wurde u.a. als ein Hinweis auf eine Beeinflussung des Proteingehalts und der En-

zymaktivitäten diskutiert. Die Sulfhydrylgruppen regulatorischer Proteine werden angegriffen und somit die Funktion dieser Proteine beeinträchtigt (MUDD, 1997).

Es gibt zahlreiche Untersuchungen über den Einfluss von oxidativem Stress auf die Ca-Konzentration und *vice versa*. MCAINSH et al. (2002) nehmen an, dass der oxidative Stress die Calcium-Homöostase der Schliesszellen beeinflusst (Erhöhung des cytosolischen Calciums) und somit den Stomatenschluss einleitet (siehe auch MCAINSH et al., 1996; PEI et al., 2000). Die O₃-Exposition (200ppb) von *Arabidopsis*-Keimlingen führte zu einer Erhöhung des cytosolischen Ca²⁺ (CLAYTON et al., 1999) und in diesem Zusammenhang erfolgte neben dem Stomatenschluss ein Anstieg der Expression von Glutathion S-Transferase (GST). Der genau Ablauf von der Erhöhung der Calciumkonzentration bis zum Stomatenschluss ist nicht bekannt. Das liegt auch daran, dass Calcium eine grosse Anzahl von Stoffwechselprozessen beeinflusst und auch als unspezifischer Cofaktor bei einer Reihe von Enzymen eine Rolle spielt.

Neben der cytosolischen ist auch die vakuoläre Ca-Konzentration wichtig für die Regulation des pflanzlichen Stoffwechsels (WHITE & BROADLEY, 2003). Im Zellsaft sind zahlreiche gelöste aber auch Kristalle schwerlöslicher Salze zu finden (MARSCHNER, 1995). Ozon bewirkte eine Änderung der Verteilung der Calciumoxalatkristalle in den Nadeln von *Picea abies* (FINK, 1991). Im Gegensatz zu den Kontrollpflanzen wurden die Calciumkristalle hauptsächlich in den Vakuolen der Neben- und Schliesszellen gefunden. Der Autor vermutet, dass unter Ozoneinwirkung ein massiver Calciumstrom zu den Schliesszellen erfolgt. In Zusammenhang mit einer Erhöhung der Calciumkonzentration in den Schliesszellen wiesen DE SILVA et al. (2001) eine Verminderung der stomatären Leitfähigkeit nach. In den eigenen Untersuchungen wurde ein vermehrtes Vorkommen vergleichbarer Kristalle beim sensitiven Klon nachgewiesen. Überschüssiges Calcium wird dem Stoffwechsel u.a. durch Speicherung als Oxalat entzogen (FRANCESCHI, 2001). Es ist denkbar, dass der sensitive Klon auf diese Weise die Energie des reaktiven, überschüssigen Sauerstoffs in Form der Calciumkristalle bindet und dadurch neutralisiert. Es wird angenommen, dass Oxalat vor allem bei der Spaltung von Ascorbat entsteht (YANG et al., 1975; KOSTMAN et al., 2001). Die in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesene Erhöhung der Ascorbatkonzentrationen könnte somit in direktem Zusammenhang mit der erhöhten Kristallbildung beim sensitiven Klon stehen. Vermutete Funktionen der Calciumoxalatbildung sind: Ionenausbalancierung, Schutzfunktion, Unterstützung bzw. Stärkung des Blattes und Detoxifikation (FRANCESCHI & HORNER, 1980).

Unter Ozoneinwirkung nimmt ausserdem im Mesophyll beider Kleeklone die Calciumkonzentration zu. Es ist vorstellbar, dass diese Zunahme im Zusammenhang mit der Einleitung einer Wundreaktion (eine Art Abwehr) steht (FINK, 1991). Da Calcium bei vielen Pflanzen im Verlauf der Seneszenz in der Blattepidermis angereichert wird

(FRICKE et al., 1995), könnte die ozonbedingte Konzentrationszunahme auch als vorzeitige Alterung interpretiert werden.

Ozonbelastung führte zu einer Erhöhung der Kaliumkonzentration in den oberen Epidermiszellen des resistenten Klons, was als Indiz für das Schließen der Stomata gewertet werden könnte. Bei ozonbehandelten sensitiven Schwammparenchymzellen findet eine Konzentrationsabnahme von Kalium und Natrium statt. Im Gegensatz dazu wird eine Zunahme der Na- und K-Konzentration in den Schwammparenchymzellen des resistenten Klones festgestellt, was auf das Vorhandensein aktiver Zellen schliessen lässt. Die Abnahme dieser beiden Elemente beim sensitiven Klon legt die Vermutung nahe, dass Ozon eine verfrühte Seneszenz bewirkt (OJANPERÄ et al., 1992; BENDER & WEIGEL, 1995).

Orthophosphat in energiereichen Verbindungen wie ATP, NADP, Triose- Pentose- und Hexosephosphate trägt wesentlich zum Energiehaushalt der Zelle bei (MARSCHNER, 1995). Anorganischer Phosphor reguliert den Calvinzyklus und den Transport von Metaboliten und Assimilaten. Phosphatmangel verursacht einen Rückstau von Assimilaten in den Chloroplasten und unterdrückt die Photosyntheseleistung (MARSCHNER, 1995). Da nach der Ozonexposition die Aktivierung von Entgiftungs- und Reparaturmechanismen zusätzliche Energie (in Form von ATP und Reduktionsäquivalenten) benötigt (und entsprechend verbrauchen) ist zu erwarten, dass der Phosphorgehalt ozonbedingt zunehmen müsste, was auch bestätigt wurde. Die Ozonbehandlung bewirkte jedoch nur beim resistenten Klon eine signifikante Erhöhung der P-Konzentration. Eventuell wurde vom resistenten Klon Energie zur Entgiftung und Reparatur benutzt.

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass der resistente Klon in seiner Funktion wenig beeinträchtigt wurde. Er weist noch mehr intakte und aktivere Zellen auf als der sensitive Klon (R: erhöhte K, P und Mg Konzentration in den Mesophyllzellen). Die größten Schädigungen des sensitiven Klons sind vorwiegend im Schwammparenchym zu sehen (niedrige K und Mg Konzentration).

Weder die stomatäre Leitfähigkeit noch die gemessenen Parameter des antioxidativen Systems können als ausreichende Erklärungen für die unterschiedliche Ozonsensitivität der beiden Kleeclone herangezogen werden. Offenbar sind strukturelle Unterschiede im Blattaufbau von größerer Bedeutung.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, Fluss-Wirkung-Beziehungen für Biomasseproduktion und das Auftreten erster sichtbarer Schadsymptome unter Freilandbedingungen zu erarbeiten. Hierzu wurde ein in den USA entwickeltes Weissklee-Indikatorsystem für bodennahes Ozon eingesetzt. Es beruht auf der unterschiedlichen Reaktion des Pflanzenwachstums und der Schadausprägung zweier unterschiedlich sensitiver Genotypen von *Trifolium repens* cv. Regal (NC-Sensitive, NC-Resistant) auf die aufgenommene Ozondosis.

Auf die Ableitung einer Fluss-Ertrag-Beziehung musste verzichtet werden, da die Bildung des NC-S / NC-R-Biomasseverhältnisses - aufgrund des schlechten Wachstums des R-Klons unter den hiesigen Klimabedingungen - nicht möglich war. Deshalb wurde eine Fluss-Wirkung-Beziehung für das Auftreten sichtbarer Schadsymptome für den sensitiven Kleeclon erarbeitet. Die Ableitung dieser Beziehung geschah mit Hilfe einer modifizierten Version des PLATIN (PLant-ATmosphere-INteraction)-Modells, die den sog. "Oasen-Effekt" berücksichtigt. Mittels gemessener Evapotranspirationsdaten wurde die Parameterisierung des stomatären Verhaltens auf Gefäßebene validiert. Eine PAD von $300 \pm 30 \text{ mgO}_3/\text{m}^2$ Grundfläche bezogen auf eine effektive LAI-Einheit und aufsummiert über 5 aufeinander folgende Tage während der Tageslichtstunden, koinzierte mit dem Auftreten sichtbarer Schadsymptome.

Desweiteren wurde untersucht worin die unterschiedliche Sensitivität der beiden Kleeclone besteht. Es wurden keine nennenswerten Unterschiede in der stomatären Leitfähigkeiten gefunden. Auch das Ascorbat / Ascorbatperoxidase-System konnte zur Beurteilung dieser unterschiedlichen Sensitivität nicht herangezogen werden. Die gemessenen Parameter Ascorbat sowie die Aktivität der unspezifischen Peroxidasen konnten vielmehr als Stressindikator gedeutet werden und spiegelten den Zustand der Zellen unter Ozon wider. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie war es möglich, im Blattaufbau deutliche Unterschiede zwischen den beiden Klonen nachzuweisen. Der sensitive Klon hat einen geringeren Anteil an Palisadenparenchym, rundlichere Palisadenparenchymzellen, ein stärker ausgeprägtes Schwammparenchym und deutlich größere Interzellularräume. Da die Größe der Interzellularen die Aufnahmekapazität für Ozon bestimmt, könnte das die Ursache für das Auftreten größerer Schäden beim sensitiven Klon sein.

6. LITERATURVERZEICHNISS

- ADAROS, G., WEIGEL, H.J., JÄGER, H.J. (1991a): Concurrent exposure to SO₂ and/or NO₂ alters growth and yield responses of wheat and barley to low concentrations of O₃. *New Phytol* 118, 581-591.
- ADAROS, G., WEIGEL, H.J., JÄGER, H.J. (1991b): Impact of ozone on growth and yield parameters of two spring wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Dis Prot* 98, 113-124.
- AL-KAISI, M., BRUN, L.J., ENZ, J.W. (1989): Transpiration and evaporation from maize as related to leaf area index. *Agric For Meteorol* 48, 111-116.
- ALSCHER, R.G. (1989): Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol Plant* 77, 457-464.
- ALTIMIR, N., TUOVINEN, J.P., VESALA, T., KULMALA, M., HARI, P. (2004): Measurements of ozone removal by Scots pine shoots: calibration of stomatal uptake model including the non-stomatal component. *Atmos Environ* 34, 2387-2398.
- ALTSHULER, S.L., ARCADO, T.D., LAWSON, D.R. (1995): Weekday vs weekend ambient ozone concentrations: Discussion and hypotheses with focus on northern California. *J Air & Waste Management Association* 45, 967-972.
- ASADA, K. (1992): Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85, 235-241.
- ASHMORE, M.R., WILSON, R.B. (1992): Critical levels of air pollutants for Europe. Background papers prepared for the United Nations Economic Commission for Europe workshop on critical levels. Egham, United Kingdom, March 23-26, 1992, London: Air Quality Division, Department of the Environment.
- BALDOCCHI, D.D., HICKS, B.B., CAMARA, P. (1987): A canopy stomatal resistance model for gaseous deposition to vegetated surfaces. *Atmos Environ* 21, 91-101.
- BENDER, J., WEIGEL, H.J. (1995): An assessment of the effects of tropospheric ozone on agricultural plants. *Berichte über Landwirtschaft* 73, 136-156.
- BENDER, J., WEIGEL, H.-J., WEGNER, U., JÄGER, H.-J. (1994): Response of cellular antioxidants to ozone in wheat flag leaves at different stages of plant development. *Environ Pollut* 84, 15-21.
- BERGMANN, E., BENDER, J., WEIGEL, H.-J. (1998): Zur Ozonempfindlichkeit von Wildpflanzenarten. Hrsg: W. Nentwig, H-M. Poehling, Verlag Agrarökologie, Bern/Hannover, 30, ISBN: 3-909192-08-4.
- BERMEJO, V., GIMENO, B.S., GRANADOS, I., SANTAMARÍA, J., IRIGOYEN, J.J., BERMEJO, R., PORCUNA, J.L., and MILLS, G. (2002): Investigating indices to explain the impacts of ozone on the biomass of white clover (*Trifolium repens* L. cv. Regal) at inland and coastal sites in Spain. *New Phytol* 156, 43-55.
- BICHELE, I., MOLDAU, H., PADU, E. (2000): Estimation of Plasmalemma conductivity to ascorbic acid and cell wall alkanization in intact leaves under ozone. *Physiol Plant* 108, 405-412.
- BRÄUNING, H. (2002): Ozoneffekte auf unterschiedliche tolerante *Phaseolus vulgaris* Varietäten- das Ascorbat- Glutathion- System und die apoplastische Stressantwort. Dissertation des Fachbereiches Biologie der Justus Liebig Universität Giessen.
- BRÄUNING, H., PAHLICH, E., MÜLLER, C., JÄGER, H.-J. (2005): Changes of the redox status of glutathione and ascorbate in leaves and apoplast of *Phaseolus vulgaris* cultivars under ozone stress. *Phyton (Austria)* 45 (3), 279-293.
- BRUN, L.J., KANEMASU, E.T., POWERS, W.L. (1972): Evapotranspiration from soybean and sorghum fields. *J Agron* 64, 145-148.

- BRUTSAERT, W. (1984): Evaporation into the atmosphere. 2nd edition. Dordrecht: Reidel.
- BURKEY, K.O., WEI, C., EASON, G., GHOSH, P., FENNER, G.P. (2000): Antioxidant metabolite levels in ozone-sensitive and tolerant genotypes of snap bean. *Physiol Plant* 110, 195-200.
- CALATAYUD, A., ALVARADO, J.W., BARRENO, E. (2002): Effects of ozone concentration on cabbage (*Brassica oleracea* L.) in a rural Mediterranean environment. *Phyton-Ann. REI Bot.* 18, 29-33.
- CAPE, J.N., SMITH, R.I., FOWLER, D. (1994): The influence of ozone chemistry and meteorology on plant exposure to photooxidants. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 102B, 11-31.
- CAPE, J.N., UNSWORTH, M.H. (1988): Deposition, uptake and residence of pollutants. In: *Air pollution and plant metabolism*, Eds. S. Schulte-Hostede, N.M. Darral, L.W. Blank, A.R. Weeburn, Elsevier Appl. Sci., London, New York, 1-18.
- CASTILLO, F.J., CREPPIN, H. (1988): Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum alba* L. leaves after ozone exposure. *Environ Exp Bot* 28, 231-238.
- CASTILLO, F.J., GREPPIN, H. (1986): Balance between anionic and cationic extracellular peroxidase activities in *Sedum album* leaves after ozone exposure. *Physiol Plant* 68, 201-208.
- CHEVONE, B., MANNING, W., VARBANOV, A., KRUPA, S. (1998): Relating ambient ozone concentrations to adverse biomass responses of white clover: a case study. *Environ Pollut* 103, 103-108.
- CLARK, A.J., LANDOLT, W., BUCHER, J.B., STRASSER, R.J. (2000): How wind affects the photosynthetic performance of trees: quantified with chlorophyll α fluorescence and open-top chambers. *Photosynth* 38, 349-360.
- CLAYTON, H., KNIGHT, M.R., KNIGHT, H., MCAINSH, M.R., HETHERINGTON, A.M. (1999): Dissection of the ozone-induced calcium signature. *Plant Journal* 17, 575-579.
- CONKLIN, P.L., WILLIAMS, E.H., LAST, R.L. (1996): Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient arabidopsis mutant. *Proc Nat Acad Sci* 93, 9970-9974.
- D'HAESE, D., VANDERMEIREN, K., ASARD, H., HOREMANS, N. (2005): Other factors than apoplastic ascorbate contribute to the differential ozone tolerance of two clones of *Trifolium repens* L. *Plant Cell Environ* 28, 623-632.
- DAVISON, A.W., NEUFELD, H.S., CHAPPELKA, A.H., WOLFF, K.W., FINKELSTEIN, P.L. (2003): Interpreting spatial variation in ozone symptoms shown by cutleaf cone flower, *Rudbeckia laciniata* L. *Environ Pollut* 125, 61-70.
- DE SILVA, D.L.R., MANSFIELD, T.A., MCAINSH, M.R. (2001): Changes in stomatal behaviour in the calcicole *Leontodon hispidus* due to the disruption by ozone of the regulation of apoplastic Ca^{2+} by trichomes. *Planta* 214, 158-162.
- DE TEMMERMAN, L., KARLSSON, G.P., DONELLY, A., OJANPERA, K., JÄGER, H.-J., FINNAN, J., BALL, G. (2002): Factors influencing visible ozone injury on potato including the interaction with carbon dioxide. *Eur J Agron* 17, 291-302.
- DEWAR, R.C. (1995): Interpretation of an empirical model for stomatal conductance in terms of guard cell function. *Plant Cell Environ* 18, 365-372.
- DIERKESMANN, R. & SANDERMANN, H. (2000): Wirkung von Ozon auf Menschen und Pflanzen. *Promet* 26, 151-161.
- DIOP, C.T., NALI, C., MESSORI, L., HEIMLER, D., LORENZINI, G. (1997): Peroxidase and superoxide dismutase activities in bean in response to ozone. *J Plant Pathol* 79, 107-113.

- DOLMAN, A.J. (1993): A multiple-source land surface energy balance model for use in general circulation models. *Agric For Meteorol* 65, 21-45.
- DOULIS, A.G., DEBIAN, N., KINGSTON-SMITH, A.H., FOYER, CH. (1997): Differential localization of antioxidants in maize leaves. *Plant Physiol* 114, 1031-1037.
- EC (1992): Richtlinie 92/72/EWG des Rates vom 21. September 1992 über die Luftverschmutzung durch Ozon. *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* Nr. L 297, 1-7.
- EGGERT, F. (2005): Standardfreie Elektronenstrahl-Mikroanalyse (mit dem EDX im Rasterelektronenmikroskop), Demand GmbH.
- ELSTNER, E.F., OSSWALD, W. (1994): Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh, Sect. B*, Crawford RMM, Hendry GAF, Goodman BA (eds.) 102, 131-154.
- EMBERSON, L.D., ASHMORE, M.R., CAMBRIDGE, H.M., SIMPSON, D., TUOVINEN, J.-P. (2000). Modelling stomatal ozone flux across Europe. *Environ Pollut* 109, 403-413.
- EU (1996): Council Directive 96/62/EC of 27 September 1996 on ambient air quality assessment and management. *Official Journal L* 296, 21/11/1996, 55-63.
- EU (2002): Directive 2002/3/EC of the European Parliament and of the Council of 12 February 2002 relating to ozone in ambient air. *Official Journal L* 067, 09/03/2002, 14-30.
- FANGMEIER, A., DE TEMMERMAN, L., BLACK, C., PERSSON, K., VORNE, V. (2002): Effects of elevated CO₂ and/or ozone on nutrient concentrations and nutrient uptake of potatoes. *Eur J Agron* 49, 353-368.
- FANGMEIER, A., KANBACH, F., JÄGER, H.J. (1993): Response of wheat photosynthesis to ozone: Exposure-response relationships achieved in greenhouse chamber fumigations. *Angew. Botanik* 67, 199-203.
- FANGMEIER, A., STEIN, W., JÄGER, H.-J. (1992): Advantages of an open-top chamber plant exposure system to assess the impact of atmospheric trace gases on vegetation. *Angew Bot* 66, 97-105.
- FARAGE, P.K., LONG, S.P. (1995): An in vivo analysis of photosynthesis during short-term O₃ exposure in three contrasting species. *Photosynth Res* 43, 11-18.
- FERDINAND, J.A., FREDERICKSEN, T.S., KOUTERICK, K.B., SKELLY, J.M. (2000): Leaf morphology and ozone sensitivity of two open pollinated genotypes of black cherry (*Prunus serotina*) seedlings. *Environ Pollut* 108, 297-302.
- FIELD, C.B., BALL, J.T., BERRY, J.A. (1989): Photosynthesis: principles and field techniques- In: PEARCY, R.W., EHLERINGER, J., MOONEY, H.A., RUNDEL, P.W. (eds) (1989): *Plant physiological ecology. Field methods and instrumentation*. Chapman and Hall, London, New York, 209-253.
- FINK S. (1991): Unusual patterns in the distribution of calcium oxalate in spruce needles and their possible relationships to the impact of pollutants. *New Phytol* 119: 41-51.
- FINKELSTEIN, PL. (2001): Deposition velocities of SO₂ and O₃ over agricultural and forest ecosystems. *Water Air Soil Pollut, Focus* 1, 49-57.
- FISHER, C.W., LEE, D., DODGE, B.A., HAMMAN, K.M., ROBBINS, J.B., MARTIN, S.E. (2000): Influence of catalase and superoxide dismutase on ozone inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 66, 1405-1409.
- FLAUM, J.B., RAO, S.T., ZURBENKO, I.G. (1996): Moderating the influence of meteorological conditions on ambient ozone concentrations. *J Air Waste Manag Assoc* 46, Iss. 1, 35-46.
- FOWLER, D., CAPE, J.N. (1982): Air pollutants in agriculture and horticulture. In: UNSWORTH, M.H., ORMROD, D.P. (Eds.), *Effects of gaseous air pollution in agriculture and horticulture*. Butterworth Scientific, London, pp. 3-26.

- FOWLER, D., FLECHARD, C., CAPE, J.N., STORETON-WEST, R.L., COYLE, M. (2001): Measurements of ozone deposition to vegetation quantifying the flux, the stomatal and non-stomatal components. *Water Air Soil Pollut* 130, 63-74.
- FOYER, C.H., HALLIWELL, B. (1976): The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133, 21-25.
- FOYER, CH., LOPEZ-DELGADO, H., DAT, F., SCOTT, I.M. (1997): Hydrogen peroxide- and glutathione- associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol Plant* 100, 241-254.
- FRANCESCHI, V.R. (2001): Calcium oxalate in plants. *Trends Plant Sciences* 6, 331.
- FRANCESCHI, V.R., HORNER H.T., JR (1980): Calcium oxalate crystals in plants, *Bot Rev* 46, 361-427.
- FRICKE, W., HINDE, P.S., LEIGH, R.A., TOMOS, A.D. (1995): Vacuolar solutes in the upper epidermis of barley leaves. Intercellular differences follow patterns, *Planta* 196, 40-49.
- FUHRER, J., ACHERMANN, B. (1994): Critical levels for ozone - a UN-ECE workshop report. FAC Schriftenreihe (Eidgenössische Forschungsanstalt für Agrikulturchemie und Umwelthygiene, Bern) 16, 1-328.
- FUHRER, J., ACHERMANN, B. (1999): Critical levels for ozone – Level II: Environmental Documentation 115, Bern, Switzerland: Swiss Agency for the Environment, Forests and Landscape.
- FUHRER, J., EGGER, A., LEHNHERR, B., GRANDJEAN, A., TSCHANNEN, W. (1989): Effects of ozone on the yield of spring wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Albis) grown in open-top field chambers. *Environ Pollut* 60, 273-289.
- FUHRER, J., GRANDJEAN GRIMM, A., TSCHANNEN, W., SHARIAT-MADARI, H. (1992): The response of spring wheat to ozone at higher altitudes. II. Changes in yield, yield components and grain quality in response to ozone flux. *New Phytol* 121, 211-219.
- FUMAGALLI, I., MIGNANEGO, L., MILLS, G. (2003): Ozone biomonitoring with clover clones: yield loss and carryover effect under high ambient ozone levels in northern Italy. *Agric Ecosyst Environ* 95, 119-128.
- GIMENO, B.S., BERMEJO, V., SANZ, J., DE LA TORRE, D., GIL, J.M. (2004): Assessment of effects of ozone exposure and plant competition on the reproductive ability of three therophytic clover species from Iberian pastures. *Atmos Environ* 38, Vol 30, issue 1-6, 2295-2303.
- GRANDJEAN, A., FUHRER, J., (1989): Growth and leaf senescence in spring wheat (*Triticum aestivum*) grown at different ozone concentrations in *open-top* field chambers. *Physiol Plant* 77, 389-394.
- GRAVANO, E., GIULIETTI, V., DESOTGIU, R., BUSSOTTI, F., GROSSONI, P., GEROSA, G., TANI, C. (2003): Foliar response of an *Ailanthus altissima* clone in two sites with different levels of ozone pollution. *Environ Pollut* 121, 137-146.
- GRULKE, N.E., PREISLER, H.K., FAN, C.C., and RETZLAFF, W.A. (2002): A statistical approach to estimate O₃ uptake of ponderosa pine in a mediterranean climate. *Environ Pollut* 119, 163-175.
- GRÜNHAGE, L. and HAENEL, H.-D. (1997): PLATIN (PLant-ATmosphere INteraction) I: a model of plant-atmosphere interaction for estimating absorbed doses of gaseous air pollutants. *Environ Pollut* 98, 37-50.

- GRÜNHAGE, L., BENDER, J., SCHAAF, S., DÄMMGEN, U., WEIGEL, H.J. and JÄGER, H.-J. (2002): A chamber-less approach to derive flux-effect relationships for crops and semi-natural vegetation. Background Document, UNECE Workshop "Establishing Ozone Critical Levels II", Göteborg, Sweden, 19-22 November (<http://www.uni-giessen.de/~gf1034/pdf/SPIDER.pdf>).
- GRÜNHAGE, L., HAENEL, H.-D., JÄGER, H.-J. (2000): The exchange of ozone between vegetation and atmosphere: micrometeorological measurement techniques and models. *Environ Pollut* 109, 373-392.
- GRÜNHAGE, L., HERTSTEIN, U., SCHLECHT-PIETSCH, S., JÄGER, H.-J. (1990). Auswirkungen von Luftverunreinigungen auf die ober- und unterirdische Biomasse eines Grünlandökosystems. In: Verein Deutscher Ingenieure (Ed.), Wirkungen von Luftverunreinigungen auf Böden. Einträge, Bewertung, Regelungen. VDI Berichte 837, Düsseldorf, pp. 633-652.
- GRÜNHAGE, L., JÄGER, H.-J. (1994): Atmospheric ozone exposure-potential for vegetation: how suitable are critical levels? In: FUHRER, J., ACHERMANN, B. (Eds): Critical Levels for Ozone - a UN-ECE workshop report. FAC Schriftenreihe (Eidgenössische Forschungsanstalt für Agrikulturchemie und Umwelthygiene, Bern) Nr. 16, 222-230.
- GRÜNHAGE, L., JÄGER, H.-J. (2001): Austausch von Stoffen zwischen Atmosphäre und Biosphäre. In: GUDERIAN, R. (Ed.): Handbuch der Umweltveränderungen und Ökotoxikologie. Band 2a: Terrestrische Ökosysteme: Immissionsökologische Grundlagen - Wirkungen auf Boden - Wirkungen auf Pflanzen. Springer, Berlin, pp. 227-271.
- GRÜNHAGE, L., JÄGER, H.-J. (2003): From critical levels to critical loads for ozone: a discussion of a new experimental and modelling approach for establishing flux-response relationships for agricultural crops and native plant species. *Environ Pollut* 125, 99-110.
- GRÜNHAGE, L., JÄGER, H.-J., HAENEL, H.-D., HANEWALD, K., KRUPA, S. (1997): PLANTIN (PLant-ATmosphere INteraction) II: co-occurrence of high ambient ozone concentrations and factors limiting plant absorbed dose. *Environ Pollut* 98, 51-60.
- GRÜNHAGE, L., JÄGER, H.-J., HAENEL, H.-D., LÖPMEIER, F.-J. and HANEWALD, K. (1999): The European critical levels for ozone: improving their usage. *Environ Pollut* 105, 163-173.
- GRÜNHAGE, L., KRAUSE, G.H.M., KÖLLNER, B., BENDER, J., WEIGEL, H.-J., JÄGER, H.-J., GUDERIAN, R. (2001): A new flux-orientated concept to derive critical levels for ozone to protect vegetation. *Environ Pollut* 111, 355-362.
- GRÜNHAGE, L., KRUPA, S.V., LEGGE, A., and JÄGER, H.-J. (2004): Ambient flux-based critical values of ozone for protecting vegetation: differing spatial scales and uncertainties in risk assessment. *Atmos Environ* 38, 2433-2437.
- GRÜTERS, U. (1998): Der Kohlenstoffhaushalt von Weizen in der Interaktion erhöhter CO₂-/O₃-Konzentration und Stickstoffversorgung, Dissertation, JLU Giessen.
- GUDERIAN, R., TINGEY, D.T., RABE, R. (1985): Effects of photochemical oxidants on plants. In GUDERIAN, R. (ed.), *Air Pollution by Photochemical Oxidants*, 129-333. Springer, Berlin.
- GUIDI, L., NALI, C., CIOMPI, S., LORENZINI, G., SOLDATINI, G.F. (1997): The use of chlorophyll fluorescence and leaf gas exchange as methods for studying the different responses to ozone of two bean cultivars. *J Experim Bot* 48, 173-179.
- HAGERMANN, A.E., RIEDL, K.M., JONES, A., SOVIK, K.N., RITCHARD, N.T., HARTZFELD, P.W., RIECHEL, T.L. (1998): High molecular weight plant polyphenolics (Tannins) as biological antioxidants. *J Agricult Food Chem* 46, 1887-1892.

- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (1989): Free radicals in biology and medicine. *Clarendon Press*, Oxford, England UK, 543 S.
- HEAGLE, A.S., MILLER, J.E. & SHERRILL, D.E. (1994): A white clover system to estimate effects of tropospheric ozone on plants. *J Environ Qual* 23, 613-621.
- HEAGLE, A.S., MILLER, J.E., CHEVONE, B. I., DRESCHER, T.W., MANNING, W.J., MC COOL, P.M., MORRISON, C.L., NEELY, G.E. & REBBECK, J. (1995): Response of white clover indicator system to tropospheric ozone at eight locations in the United States. *Water, Air Soil Pollut* 85, 1373-1378.
- HEAGLE, A.S., REINERT, R.A. & MILLER, J.E. (1996): Response of white clover to ozone in different environments. *J Environ Qual* 25, 273-278.
- HEAGLE, A.S., STEFANSKI, L.A. (2000): Relationships between ambient ozone regimes and white clover forage production using different ozone exposure indexes. *Atmos Environ* 34, 735-744.
- HEATH, L.R. (1994): Possible mechanisms for the inhibition of photosynthesis by ozone. *Photosynth Research* 39, 439-451.
- HEATH, R.L. & CASTILLO, F.J. (1988): Membrane disturbances in response to air pollutants. In: *Air pollution and plant metabolism*. Elsevier Applied Science, London, New York, 55-75.
- HEATH, R.L. (1975): Ozone. In: J.B. MUDD & T.T. KOZLOWSKI (Eds.): *Response of plants to air pollution*. Academic Press, New York, 23-55.
- HEATH, R.L. (1987): The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells. *Advanc Phytochem* 21, 29-54.
- HEGGESTAD, H.E. (1991): Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environ Pollut* 74, 264-291.
- HICKS, B.B., BALDOCCHI, D.D., MEYERS, T.P., HOSKER, R.P., MATT, D.R. (1987): A preliminary multiple resistance routine for deriving dry deposition velocities from measured quantities. *Water, Air Soil Pollut* 36, 311-330.
- HINDE, P., RICHARDSON, R., KOYRO, H.-W., TOMOS, A.D. (1998): Quantitative X-ray microanalysis of solutes in individual plant cells: a comparison of microdroplet and in situ frozen-hydrated data. *J. Microscopy*, 191, 303-310.
- HIPPEL, S., ELSTNER, E.F. (1996): Mechanisms of oxygen activation during plant stress: Biochemical effects of air pollutants. *J Plant Physiol* 148, 249-257.
- HOREMANS, N., FOYER, C.H., ASARD, H. (2000): Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends Plant Science* 5, 263-267.
- HUSTED, S.U., SCHJOERRING, J.K. (1995): Apoplastic pH and ammonium concentration in leaves of *Brassica napus* L. *Plant Physiol* 109, 1453-1460.
- JÄGER, H.-J., KRUPA, S.V. (2005). Hormesis- Its relevance in phyto-toxicology. In: LEGGE, A.H. (Ed.), *Relating atmospheric apportionment to vegetation effects: establishing cause and effect relationships*. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands (in press).
- JÄGER, H.J., WEIGEL, H.J., GRÜNHAGE, L. (1986): Physiologische und biochemische Aspekte von Immissionen auf Waldbäume. *Eur J For Path* 16 (2), 98-109.
- JARVIS, P.G. (1976): The interpretation of the variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in the field. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* 273, 593-610.
- JARVIS, P.G. (1995). Scaling processes and problems. *Plant, Cell Environ* 18, 1079-1089.
- JIN, M.H., FENG, Z.W., ZHANG, F.Z. (2001): Impacts of ozone on the biomass and yield of rice in *open-top* chambers. *J Environ Sci* 13, 233-236.

- KAMPFENKEL, K., VANMONTAGU, M., INZÉ, D. (1995): Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Annal Biochem* 225, 165-167.
- KÄRENLAMPI, L., SKÄRBY, L. (1996): Critical levels for ozone in Europe: testing and finalizing the concepts. UN-ECE workshop report. Kuopio: University of Kuopio, Department of Ecology and Environmental Science, p.363.
- KARLSSON, G.P., SELLDEN, G., SKÄRBY, L., PLEIJEL, H. (1995): Clover as an indicator plant for phytotoxic ozone concentrations: visible injury in relation to species, leaf age and exposure dynamics. *New Phytol* 129, 355-365.
- KARLSSON, P.E., SELLDÉN, G., PLEIJEL, H. (2003): Establishing ozone critical levels II. UNECE Workshop Report. IVL report B 1523. Gothenburg, Sweden: IVL Swedish Environmental Research Institute.
- KELLIHER, F.M., LEUNING, R., RAUPACH, M.R., SCHULZE, E.-D. (1995): Maximum conductances for evaporation from global vegetation types. *Agric For Meteorol* 73, 1-16.
- KELLOMÄKI, S. & WANG, K-Y. (1997): Effects of elevated O₃ and CO₂ concentrations on photosynthesis and stomatal conductance in Scots pine. *Plant Cell Environ* 20, 995-1006.
- KELLY, F.J., MUDWAY, I., KRISHNA, M.T., HOLGATE, S.T. (1995): The free radical basis of air pollution: focus on ozone. *Respir Med* 89, 647-656.
- KERSTIENS, G., FEDERHOLZNER, R., LENDZIAN, K.J. (1992): Dry deposition and cuticular uptake of pollutant gases. *Agric Ecosys Environ* 42, 239-253.
- KERSTIENS, G., LENDZIAN, K.J. (1989): Interactions between ozone and plant cuticles. I. Ozone deposition and permeability. *New Phytol* 112, 13-19.
- KESSELMEIER, J., & STAUDT, M. (2000): Biogene flüchtige Kohlenwasserstoffe. In: Guderian R. (Hrsg.) *Handbuch der Umweltveränderungen und Ökotoxikologie*, Band I/1 Atmosphäre, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- KIRCHHOFF, G. (1845): Über den Durchgang eines elektrischen Stromes durch eine Ebene, insbesondere durch eine kreisförmige. *Ann Phys Chem - Poggendorffs Ann* 64, 497-514.
- KIVIMÄENPÄÄ, M., JÖNSSON, A.M., STJERNQUIST, I., SELLDEN, G., SUTINEN, S. (2004): The use of light and electron microscopy to assess the impact of ozone on Norway spruce needles. *Environ Pollut* 127, 441-453.
- KLAPHECK, S. (1988): Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol Plant* 74, 727-732.
- KLEY, D., KLEINMANN, M., SANDERMANN, H., KRUPA, S. (1999): Photochemical oxidants: State of the science. *Environ Pollut* 100, 19-42.
- KOBAYASHI, K., OKADA, M., NOUCHI, I. (1995): Effects of ozone on dry matter partitioning and yield of Japanese cultivars of rice (*Oryza Sativa* L.). *Agric Ecosys Environ* 53, 109-122.
- KOLLIST, H., MOLDAU, H., MORTENSEN, L., RASMUSSEN, S.K., JØRGENSEN, L.B. (2000): Ozone flux to plasmalemma in barley and wheat is controlled by stomata rather than by direct reaktion of ozone with cell wall ascorbate. *J Plant Physiol* 156, 645-651.
- KOLLIST, H., MOLDAU, H., MORTENSEN, L., RASMUSSEN, S.K., JØRGENSEN, L.B. (1996): Ascorbate levels and ozone decay in the cell walls of barley and wheat seedlings. In: OBINGER, C., BURNER, U., EBERMANN, R., PENEL, C., GREPPIN, H. (eds). *Plant peroxidases: biochemistry and physiology. IV International Symposium, Vienna*, 363-368.

- KOLLNER, B., KRAUSE, G.H.M. (2002): Assessment of the response of the NC-S/NC-R clover clone system to ambient ozone levels at the Ruhr valley. *Water Air soil Pollut* 137, 63-79.
- KOSEGARTEN, H., KOYRO, H.-W. (2001): Apoplastic accumulation of iron in the epidermis of maize (*Zea mays*) roots grown in calcareous roots. *Physiol Plant*, 113/4, 515-522.
- KOSTMAN, T.A., TARLYN, N.M, LOEWUS, F.A., FRANCESCHI V.R. (2001): Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. *Plant Physiol* 125 634-640.
- KOYRO, H.-W. (2000): Untersuchungen zur Anpassung der Wildr ube (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) an Trockenstress und NaCl-Salinit t. Habilitationsschrift zur Erlangung der *venia legendi* an der naturwissenschaftlichen Fakult t der Justus-Liebig-Universit t Giessen.
- KRUPA, S.V., KICKERT, R.N. (1992): The greenhouse effect: the impacts of carbon dioxide (CO₂), ultraviolet-B (UV-B) radiation and ozone (O₃) on vegetation (crops). *Veget* 104/105, 223-238.
- KRUPA, S.V., MANNING, W.J. (1988): Atmospheric Ozone: formation and effects on vegetation. *Environ Pollut* 50, 101-137.
- KRUPA, S.V., NOSAL, M., LEGGE, A.H. (1994): Ambient ozone and crop loss: establishing a cause-effect relationship. *Environ Pollut* 83, 269-276.
- LAISK, A., KULL, O., MOLDAU, H. (1989): Ozone concentration in leaf intercellular air spaces is close to zero. *Plant Physiol* 90, 1163-1167.
- LANDESUMWELTAMT NRW (Hrsg): TEMES Monatsbericht August 1997. Kontinuierliche telemetrische Luftqualit tsmessungen, ISSN 0947-9060, Essen 1997.
- LANGEBARTELS, C., WOHLGEMUTH, H., KSCHIESCHAN, S., GR N, S., SANDERMANN, H. (2002): Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol Biochem* 40, 567-575.
- LAW, M.Y., CHARLES, S.A., HALLIWELL, B. (1983): Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *J Biochem* 210, 899-903.
- LEE, J.C., SKELLY, J.M., STEINER, K.C., ZHANG, J.W., SAVAGE, J.E. (1999): Foliar response of black cherry (*Prunus serotina*) clones to ambient ozone exposure in central Pennsylvania. *Environ Pollut* 105, 325-331.
- LEFOHN, A.S. (1991): Surface level ozone exposures and their effects on vegetation. Lewis Publishers, Boca Raton, FA, 400pp.
- LEUNING, R., KELLIHER, F.M., DE PURY, D.G.G., SCHULZE, E.-D. (1995): Leaf nitrogen, photosynthesis, conductance and transpiration: scaling from leaves to canopies. *Plant Cell Environ* 18, 1183-1200.
- LUCAS, P.W., RANTANEN, L., MEHLHORN, H. (1993): Needle chlorosis in Sitka spruce following a three-year exposure to low concentrations of ozone: changes in mineral content, pigmentation and ascorbic acid. *New Phytol* 124, 265-275.
- LUWE, M. (1996): Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves: seasonal variations and responses to changing ozone concentrations in air. *Plant Cell Environ* 19, 321-328.
- LUWE, M.W.F., HEBER, U. (1995): Ozone detoxification in the apoplasm and symplasm of spinach, broad bean and beech leaves at ambient and elevated concentrations of ozone in air. *Planta* 197,448-455.
- LUWE, M.W.F., TAKAHAMA, U., HEBER, U. (1993): Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol* 101, 969-976.

- LYONS, T., OLLERENSHAW, J.H., BARNES, J.D. (1999): Impacts of ozone on *Plantago major*: apoplastic and symplastic antioxidant status. *New Phytol* 141, 253-263.
- MÄCHLER, F., WASESCHA, M.R., KRIEG, F., OERTLI, J.J. (1995): Damage by ozone and protection by ascorbic acid in barley leaves. *J Plant Physiol* 147, 469-473.
- MACKERNESS, S.A.H., JORDAN, B.R., THOMAS, B. (1999): Reactive oxygen species in the regulation of photosynthetic genes by ultraviolet- B-radiation (UB-B: 280-320nm) in green and etiolated bud of pea (*Pisum sativum* L.). *J. Photochem Photobiol B* 48, 180-188.
- MAGUHN, J., SELINGER, H., ZIEGLER-JÖNS, A., KNOPPIK, D. (1994): Die Wirkung von Photooxidantien auf Sommerweizen (*Triticum aestivum* L. Star). *Z Umweltchem Ökotox* 6, 123-130.
- MANDERSCHIED, R., JÄGER, H.-J., SCHOENEBERGER, M.M. (1991): Dose-response relationships of ozone effects on foliar levels of antioxidants, soluble polyamines and peroxidase activity of *Pinus taeda* (L.): assessment of the usefulness as early ozone indicators. *Angew Botanik* 65, 373-386.
- MANNING, W.J., VON TIEDEMANN, A. (1995): Climate change: potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO₂), ozone (O₃), and ultraviolet-B (UV-B) radiation on plant diseases. *Environ Pollut* 88, 219-245.
- MARENCO, A., GOUGET, H., PHILIPPE, N., PAGES, J.-P., KARCHER, F. (1994): Evidence of a long term increase in tropospheric ozone from Pic du Midi data series: Consequences: Positive radiative forcing. *J Geophys Res* 99, No D8 ,16617-16632.
- MARSCHNER, H. (1995): Mineral nutrition of higher plants. Second edition, London, Academic Press.
- MAUZERALL, D.L. & WANG, X. (2001): Protecting agricultural crops from the effects of tropospheric ozone exposure: reconciling science and standard setting in the United States, Europe and Asia. *Ann Rev Energy Environ* 26, 237-268.
- MCAINSH, M.R., CLAYTON, C., MANSFIELD, T.A., HETHERINGTON, A.M. (1996): Changes in stomatal behaviour and guard cell cytosolic free calcium in response to oxidative stress. *Plant Physiol* 111, 1031-1042.
- MCAINSH, M.R., EVANS, N.H., MONTGOMERY, L.T., NORTH, K.A. (2002): Calcium signalling in stomatal responses to pollutants. *New Phytol* 153, 441-447.
- MCCAY, P.B. (1985): Vitamin E: Interactions with free radicals and ascorbate. *Ann Rev Nutr* 5, 323-340.
- MCLAUGHLIN, S.B., TAYLOR, G.E.JR. (1981): Relative humidity: Important modifier of pollutant uptake by plants. *Science* 211, 167-69.
- MEHLHORN, H., TABNER, B.J., WELLBURN, A.R. (1990): Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plants exposed to ozone. *Physiol Plant* 79, 377-383.
- MEISTER, A., ANDERSON, M.E. (1983): Glutathione. *Ann Rev Biochem* 52, 711-760.
- MILLS, G., HAYES, F., and EMBERSON, L. (2002): Modelling stomatal conductance and ozone flux for NC-S and NC-R white clover (*Trifolium repens*) biotypes: statistical and multiplicative flux modelling. In: Background Document. Joint ICP Vegetation/EMEP Ad-hoc Expert Panel Meeting on Modelling and Mapping of Ozone Flux and Deposition to Vegetation to be held under the UN/ECE Convention on Long-range Transboundary Air Pollution. Harrogate, U.K., 16-19 June.
- MOLDAU, H. (1998): Hierarchy of ozone scavenging reactions in the plant cell wall. *Physiol Plant* 104, 617-622.

- MOLDAU, H., BICHELE, I. (2002): Plasmalemma protection by the apoplast as assessed from above-zero ozone concentration in leaf intercellular air spaces. *Planta* 214, 484-487.
- MÖLLER, D. (2003): *Luft-Chemie, Physik, Biologie, Reinhaltung, Recht*. Berlin: de Gruyter.
- MONTEITH, J.L. (1995): A reinterpretation of stomatal responses to humidity. *Plant Cell Environ* 18, 357-364.
- MORAN, J.F., ITURBE-ORMAETXE, I., MATAMOROS, M.A., RUBIO, M.C., CLEMENTE, M.R., BREWIN, N.J., BECANA, M. (2000): Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression and subcellular localization. *Plant Physiol* 124, 1381-1392.
- MOTT, K.A., PARKHURST, D. F. (1991): Stomatal response to humidity in air and helox. *Plant Cell Environ* 14, 509-515.
- MUDD, J.B. (1982): Effects of oxidants on metabolic function. In: *Effects of Gaseous Air Pollution in Agriculture and Horticulture*, M.H. UNSWORTH & D.P. ORMROD (eds), Butterworth Scientific, London, 189-203.
- MUDD, J.B. (1996): Biochemical basis for the toxicity of ozone. In: Yunus, M. and Iqbal M. (Eds.): *Plant response to air pollution*. Wiley and Sons, Chicester, 267-283.
- MUDD, J.B. (1997): Biochemical basis for the toxicity of ozone. In: *Plant responses to air pollution*. Yunus M, Iqbal M (eds) NY: John Wiley & Sons, 267-284.
- MUDD, J.B., BANERJEE, S.K., DOOLEY, M.M., KNIGHT, K.L. (1984): Pollutants and plant cells: effects on membranes. In: *Gaseous Air Pollutants and Plant Metabolism*, M.J. KOZIOL & F.R. WHATLEY (eds) Butterworth Scientific, London, 105-116.
- NAKANO, Y., ASADA, K. (1987): Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant Cell Physiol* 28, 131-140.
- NIE, G.Y., TOMASEVIC†, M., BAKER, N.R. (1993): Effects of ozone on the photosynthetic apparatus and leaf proteins during leaf development in wheat. *Plant Cell Environ* 16, 643-651.
- OHLENSCHLÄGER, G. (1995): Was sind freie Radikale. *GIT Labor-Magazin* 18, 337-349.
- OJANPERÄ, K., SUTINEN, S., PLEIJEL, H., SELLDÉN, G. (1992): Exposure of spring wheat, *Triticum aestivum* L., cv. Drabant, to different concentrations of ozone in *open-top* chambers: effects on the ultrastructure of flag leaf cells. *New Phytol* 120, 39-48.
- OKAMURA, M. (1980): An improved method for determination of l-ascorbic acid and l-dehydroascorbic acid in blood plasma. *Clin Chim Acta* 103, 259-268.
- OKSANEN, E., SOBER, J., KARNOSKY, D.F. (2001): Impacts of elevated CO₂ and /or O₃ on leaf ultrastructure of aspen (*Populus tremuloides*) and birch (*Betula papyrifera*) in the Aspen FACE experiment, *Environ Pollut* 115, 437-446.
- OLLERENSHAW, J.H., LYONS, T., BARNES, J.D. (1999): Impacts of ozone on the growth and yield of field-grown winter oilseed rape. *Environ Pollut* 104, 53-59.
- OTTER, T. & POLLE, A. (1997): Characterisation of acidic and basic apoplastic peroxidases from needles of Norway Spruce (*Picea abies*, L., Karsten) with respect to lignifying substrates. *Plant Cell Physiol* 38, 595-602.
- PACIFICI, R.E., DAVIES, K.J.A. (1990): Protein degradation as an index of oxidative stress. *Meth Enzym* 186, 485-502.
- PACKER, L., WEBER, S.U., RIMBACH, G. (2001): Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signaling. *J Nutr* 131, 369S-373S.

- PASQUALINI, S., PICCIONI, C., REALE, L., DELLA TORRE, E.G., FERRANTI, F. (2003): Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiol* 133, 1122-1134.
- PEI, Z.M., MURATA, Y., BENNING, G., THOMINE, S., KLÜSENER, B., ALLEN, G.J., GRILL, E., SCHROEDER, J.I. (2000): Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406, 731-734.
- PENEL, C. & CASTILLO, F.J. (1989): Peroxidases of plant plasma membranes, apoplastic ascorbate, and relation of redox activities to plant pathology. In: CRANE, F.L., MORE, D.J., LOW, J.E. (eds). *Oxidoreduction at the plasmamembran*. Chapter 7, Volume II, 121-147.
- PETERS, J.L. CASTILLO, F.J., HEATH, R.L. (1989): Alteration of extracellular enzymes in Pinto bean leaves upon exposure to air pollutants, ozone and sulfur dioxide. *Plant Physiol* 89, 159-164.
- PFIRRMANN, T., BARNES, J.D., STEINER, K., SCHRAMMEL, P., BUSCH, U., KÜCHENHOFF, H., PAYER, H-D. (1996): Effects of elevated CO₂, O₃ and K deficiency on Norway spruce, *Picea abies*: nutrient supply, content and leaching. *New Phytol* 134, 267-278.
- PIGNOCCHI, C., FOYER, CH. (2003): Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Curr Opin Plant Biol* 6, 379-389.
- PLATTNER, H., ZINGSHEIM, H.-P. (1987): *Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie (Ein kritischer Leitfaden zur biologischen Ultrastrukturforschung für Biologen und Mediziner)*. Stuttgart, Fischer Verlag.
- PLÖCHL, M., LYONS, T., OLLERENSHAW, J.H., BARNES, J.D. (2000): Simulating ozone detoxification in the leaf apoplast through the direct reaction with ascorbate. *Planta* 210, 454-467.
- POLLE, A., WIESER, G., HAVRANEK, W.H. (1995): Quantification of ozone influx and apoplastic ascorbate content in needles of norway spruce trees (*Picea abies* L. Karst) at high altitude. *Plant Cell Environ* 18, 681-688.
- PORG, (1997): *Ozone in the United Kingdom. Fourth report of the Photochemical Oxidants Group 1997*. London: Department of the Environment, Transport and the Regions.
- POSTIGLIONE, L., FAGNANO, M., MEROLA, G. (2000): Response to ambient ozone of two white clover (*Trifolium repens* L.cv. „Regal“) clones, one resistant and one sensitive, grown in a Mediterranean environment. *Environ Pollut* 109, 525-531.
- PRYOR, S.C., STEYN, D.G. (1995): Hebdomadal and diurnal cycles in ozone time series from the Lower Fraser Valley, BC. *Atmos Environ* 29, 1007-1019.
- RANIERI, A., CASTAGNA, A., PADU, E., MOLDAU, H., RAHI, M., SOLDATINI, G.F. (1999): The decay of O₃ through direct reaction with cell wall ascorbate is not sufficient to explain the different degrees of O₃ sensitivity in two poplar clones. *J Plant Physiol* 154, 250-255.
- RANIERI, A., URSO, G.D., NALI, C., LORENZINI, G., SOLDATINI, G.F. (1996): Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiol Plant* 97, 381-387.
- RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 20, 933-956.
- RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G. (1997): Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2, 152-159.
- RICHARDS, B.L., MIDDLETON, J.T., HEWITT, W.B. (1958): Air pollution with relation to agronomic crops: V. Oxidant stipple of grapes. *J Agron* 50, 559-561.

- RIEMER, J. & WHITTACKER, J.B. (1989): Air pollution and insect herbivores: observed interactions and possible mechanism. In: BERNAYS, E.A (Ed.): Insect-plant interactions. CRC Press, Boca Raton, 73-105.
- RITCHIE, J.T., BURNETT, E. (1971) : Dryland evaporative flux in subhumid climate: II Plant influences. J Agron 63, 56-62.
- ROBAK, J., GRYGLEWSKI, R.J. (1998): Flavonoides are scavengers of superoxide anions. Biochem Pharmacol 37, 837-841.
- ROGERS, H.H., HECK, W.W., HEAGLE, A.S. (1983): A field technique for the study of plant responses to elevated carbon dioxide concentration. Journal of the Air Pollution Control Association 33, 42-44, in: ALLEN, L.H., DRAKE, B.G., ROGERS, H.H., SHINN, J.H. (1992): Field techniques for exposure of plants and ecosystems to elevated CO₂ and other trace gases. Critical Reviews in Plant Sciences 11, 85-119.
- RUNECKLES, V.C. (1992): Uptake of ozone by vegetation. In: Surface-level ozone exposures and their effects on vegetation. (Ed.) A.S. LEFOHN, Chelsea, Lewis Publishers, 157-188.
- RUNECKLES, V.C., CHEVONE, B.I. (1992): Crop response to ozone. In: LEFOHN, A.S (Eds): Surface level ozone exposures and their effects on vegetation. Chelsea, Lewis, 189-270.
- RUNECKLES, V.C., VAARTNOU, M. (1997): EPR evidence for superoxide anion formation in leaves during exposure to low levels of ozone. Plant Cell Environ 20, 306-314.
- SAKURAI, N. (1998): Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. J Plant Res 111, 133-148.
- SANDELIUS, A., NASLUND, K., CARLSSON, A., PLEIJEL, H., SELLDEN, G. (1995): Exposure of spring wheat (*Triticum aestivum*) to ozone in open-top chambers. Effects on acyl lipid composition and chlorophyll content of flag leaves. New Phytol 131, 231-239.
- SCHRAUDNER, M., LANGEBARTELS, C., SANDERMANN, H. (1996): Plant defence systems and ozone. Biochem Soc Trans 24, 456-461.
- SEHMEL, G.A. (1980): Particle and gas dry deposition: a review. Atmos Environ 14, 983-1011.
- SHARMA, Y.K., DAVIS, K.R. (1994): Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 105, 1089-1096.
- SHEN, B., JENSEN, R.G., BOHNERT, H.J. (1997): Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. Plant Physiol 115, 527-532.
- SIEFERMANN-HARMS, D., PAYER, HD., SCHRAMEL, P., LUTZ, C. (2005): The effect of ozone on the yellowing process of magnesium-deficient clonal Norway spruce grown under defined conditions. Plant Physiol 46, 195-206.
- SIEGEL, B.Z. (1993): Plant peroxidases-an organismic perspective. Plant Growth Reg 12, 303-312.
- SKÄRBY, L., RO-POULSEN, H., WELLBURN, F.A.M., SHEPPARD, L.J. (1998): Impacts of ozone on forest: a european perspective. New Phytol 139, 109-122.
- SMIRNOFF, N., WHEELER, G.L. (2000): Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. Crit Rev Biochem Mol Biol 35, 291-314.
- STEDUTO, P., HSIAO, T.C. (1998): Maize canopies under two soil water regimes. II. Seasonal trends of evapotranspiration, carbon dioxide assimilation and canopy conductance, and as related to leaf area index. Agr For Meteorol 89, 185-200.
- STEWART, J.B. (1988): Modelling surface conductance of pine forest. Agric For Meteorol 43, 19-35.

- TAKAHAMA, U. (1998): Ascorbic acid-dependent regulation of redox levels of chlorogenic acid and its isomers in the apoplast of leaves of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Physiol* 39, 681-689.
- TAKAHAMA, U., ONIKI, T., SHIMOKAWA, H. (1996): A possible mechanism for the oxidation of sinapyl alcohol by peroxidase-dependent reactions in the apoplast: Enhancement of the oxidation by hydroxycinnamic acids and components of the apoplast. *Plant Cell Physiol* 37, 499-504.
- TANG, Y., CHEVONE, B.I., HESS, J.L. (1999): Ozone-responsive proteins in a tolerant and sensitive clone of white clover (*Trifolium repens*). *Environ Pollut* 104, 89-98.
- THOMAS, M.D. (1961): Effects of air pollution on plants. *Air Pollution*, World Health Organization Monograph Series 46, 233-278.
- TOKARSKA-SCHLATTNER, M., FINK, A., CASTILLO, F.J., CRESPI, P., CREVECOEUR, H., CREPPIN, H., TACCHINI, P. (1997): Effects of ozone on the plasma membrane proteins in *Arabidopsis thaliana* L. leaves. *Plant Cell Environ* 20, 1205-1211.
- TURCSANYI, E., LYONS, T., PLOCHL, M., BARNES, J. (2000): Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.). *J Exp Bot* 51, 901-910.
- UBA – UMWELTBUNDESAMT (1996): Manual on methodologies and criteria for mapping critical levels/loads and geographical areas where they are exceeded. Texte 71/96. Umweltbundesamt, Berlin.
- UNECE (1988): ECE critical levels. Final draft report of ECE critical levels Workshop, Bad Harzburg, Germany, 14-18 March 1988. United Nations-Economic Commission for Europe.
- UNECE (1999): Protocol to the 1979 Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution to Abate Acidification, Eutrophication and Ground-Level Ozone, Gotheburg, 30 November
- UNECE (2001): ICP Vegetation experimental Protocol for 2001. ICP Vegetation Coordination Centre, CEH Bangor, UK.
- UNECE (2004): Manual on methodologies and criteria for modelling and mapping critical loads & levels and air pollution effects, risks and trends. Umweltbundesamt, Berlin, Germany (<http://www.oekodata.com/icpmapping/>).
- UNECE-Protokoll (1996-1999): Air pollution and Vegetation. Annual Protocol. ICP-Vegetation Coordination Centre, CEH Bangor, University of Wales, Bangor, UK
- URBACH, W., SCHMIDT, W., KOLBOWSKI, J., RÜMMELE, S., REISBERG, E., STEIGNER, W., SCHREIBER, U. (1989): Wirkungen von Umweltschadstoffen auf Photosynthese und Zellmembranen von Pflanzen. Projektgruppe Bayern zur Erforschung der Wirkung von Umweltschadstoffen (PBWU). Proc. 1. Statusseminar der PBWU zum Forschungsschwerpunkt "Waldschäden". 27.02.-01.03.1989. München-Neuherberg, 195-206.
- USHIMARU, T., MAKI, Y., SANO, S., KOSHIBA, K., ASADA, K., TSUJI, H. (1997): Induction of enzymes involved in the ascorbate-dependent antioxidative system, namely, ascorbate peroxidase, monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase, after exposure to air of rice (*Oryza sativa*) seedlings germinated under water. *Plant Cell Physiol* 38, 541-549.
- VAN EIMERN, J. & HÄCKEL, H. (1984): *Wetter- und Klimakunde*. Stuttgart: Ulmer
- VAN HOVE, LWA BOSSEN ME SAN GABINO BG SGREVA C (2001): The ability of apoplastic ascorbate to protect poplar leaves against ambient ozone concentrations: a quantitative approach. *Environ Pollut* 30, 371-382.
- VANACKER, H., HARBINSON, J., RUISCH, J., CARVER., T.L.W., FOYER, C.H. (1998): Antioxidant defense of the apoplast. *Protopl* 205, 129-140.

-
- VELISSARIOU, D: Ozone injury in Greece (<http://www.ncl.ac.uk/airweb/ozone/ozimg.htm>).
- VON WILLERT, D.J., MATYSSEK, R., HERPPICH, W. (1995): Experimentelle Pflanzenökologie: Grundlagen und Anwendungen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- WALL, G.W., KANEMASU, E.T. (1990): Carbon dioxide exchange rates in wheat canopies: part I. Influence of canopy geometry on trends in leaf area index, light interception and instantaneous exchange rates. *Agric For Meteorol* 49, 89-102.
- WALLIN, G., KARLSSON, P.E., SELLDEN, G., OTTOSSON, S., MEDIN, E.L., PLEIJEL, H., SKÄRBY, L. (2002): Impact of four years exposure to different levels of ozone, phosphorus and drought on chlorophyll, mineral nutrients, and stem volume of Norway spruce, *Picea abies*. *Physiol Plant* 114, 192-206.
- WANG, D., HINCKLEY, T.M., CUMMING, A.B., BRAATNE, J. (1995): A comparison of measured and modeled ozone uptake into plant leaves. *Environ Pollut* 89(3), 247-254.
- WARLEY, A. (1997): X-ray Microanalysis for Biologists, Portland Press.
- WEBB, A.A.R., TAYLOR, J.E., MCAINSH, M.R., HETHERINGTON, A.M. (1996): Calcium ions as intracellular second messengers in plants. *Advanc Botanic Res* 22, 45-96.
- WEIGEL, H.J., HALBWACHS, G., JÄGER, H.J. (1989): The effects of air pollutants from a plant physiological view. *Pfl Krank* 96, 203-217.
- WHITE, P.J., BROADLEY, M.R. (2003): Calcium in Plants, *Ann Bot* 92, 487-511.
- WILSON, P.J., THOMPSON, K., HODGSON, J.G. (1999): Specific leaf area and leaf dry matter content as alternative predictors of plant strategies. *New Phytol* 143, 155-162.
- YANG J., LOEWUS, F.A. (1975): Metabolic conversion of L-ascorbic acid in oxalate-accumulating plants. *Plant Physiol* 56, 283-285.
- ZHENG, Y., LYONS, T., OLLERENSHAW, J., BARNES, J.D. (2000): Ascorbate in the leaf apoplast is a factor mediating ozone resistance in *Plantago major*. *Plant Physiol Biochem* 38, 403-411.
- ZÖRB, C. (1994): Biochemische Grundlagen der Ozonresistenz bei Weißklee (*Trifolium repens*). Eine Untersuchung des antioxidativen Systems in unterschiedlich Ozonempfindlichen Weißklee-Klonen nach Exposition gegenüber O₃ und CO₂. Diplomarbeit am Institut für Pflanzenökologie des Fachbereichs Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H.-J. Jäger danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes, sowie der uneingeschränkten Nutzung aller Einrichtungen. Er war auch immer mit freundlichem Zuhören bei der Lösung aller nur denkbaren Probleme dabei.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. habil. Ludger Grünhage, der mich in der schweren Zeit des Schreibens bei der Lösung jeglicher Probleme unterstützt hat. Besten Dank an Dr. habil. H-W. Koyro, der immer ein offenes Ohr für alle möglichen Probleme während der Doktorandenzeit hatte. Es hat Spaß gemacht, Stunden vor dem REM zu sitzen und dabei so interessant diese Methode zu erlernen. Durch diese drei Personen war es möglich, die Distanz zwischen Griechenland und Deutschland zu minimieren.

An dieser Stelle möchte ich auch Frau Birte Lenz danken für die so schöne Zusammenarbeit. Sie hat das Laborleben sehr angenehm gemacht. Es hat wirklich Spaß gemacht, zusammen zu ernten und zu infiltrieren! Allen Angestellten im Gewächshaus des Instituts, Herrn Jürgen Franz, Herrn Jochen Senkbeil danke ich für ihre freundliche Aufnahme und Hilfestellung bei der An- und Aufzucht der Pflanzen. Danke auch für das "jahrelange" Schleppen meiner Töpfe von einem Ort zum anderen! Außerdem möchte ich Herrn W. Stein, Herrn G. Mayer und Frau G. Bölke für die freundliche Unterstützung bei technischen Problemen danken. Frau Dr. Heike Bräuning möchte ich hiermit herzlich danken für das rasche Korrekturlesen und die unzähligen schönen Stunden beim Infiltrieren. Frau Dr. Claudia Kammann, die trotz der erschwerten Bedingungen der Schwangerschaft einen Teil der Arbeit Korrektur gelesen hat.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen Eltern und besonders meiner Mutter, die die ganze letzte Zeit des Zusammenschreibens zahllose Stunden auf meine beiden Söhne aufgepasst hat. Somit war es überhaupt erst möglich, mit gutem Gewissen weiterzumachen. Meinem Mann, der diese lange Zeit der Doktorarbeit ertragen mußte und oft seine eigenen Bedürfnisse auf die Seite gestellt hat. Ein besonderer Dank gilt auch meinem guten Freund Michael, der immer bereit war zu helfen. Ich danke allen Freunden (Birte, Heike, Sofia, Christina) und meiner Schwester, die durch ihr Verständnis und ihre moralische und psychische Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit eine große Hilfe waren.

Ohne die Hilfe all dieser Menschen wäre diese Arbeit gar nicht entstanden.

Anhang 1

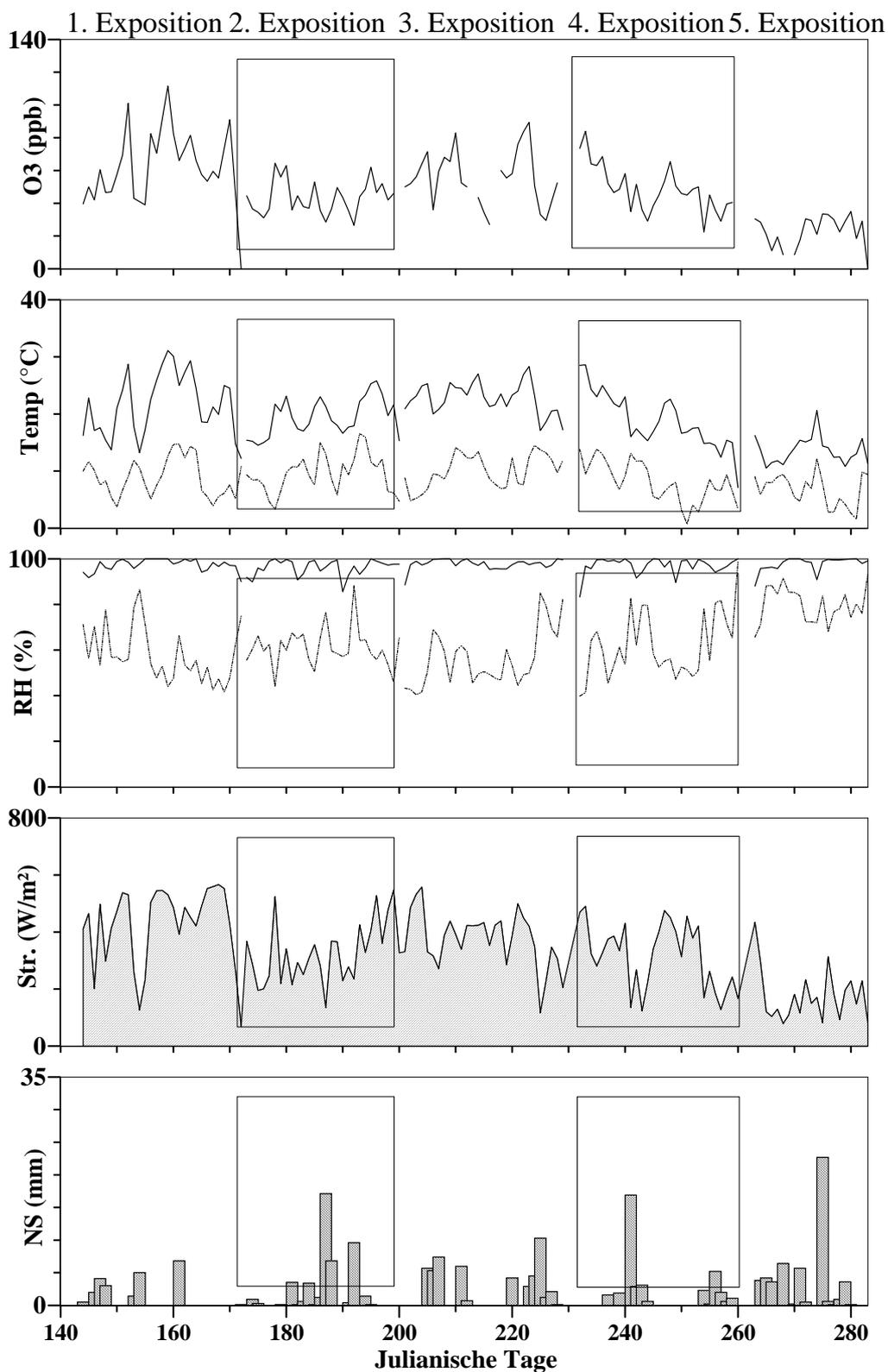


Abb. 73: Gemessene Tagesmittelwerte verschiedener Klimaparameter für jede Exposition des Jahres 1996

(O₃: Tagesmittelwerte der maximalen Ozonkonzentration; Temp: Tagesmittelwerte der minimalen und maximalen Temperatur; RH: Tagesmittelwerte der minimalen und maximalen relativen Luftfeuchtigkeit; Str: Tagesmittelwerte der Globalstrahlung (>50 W/m²); NS: Tagessummen der Niederschläge).

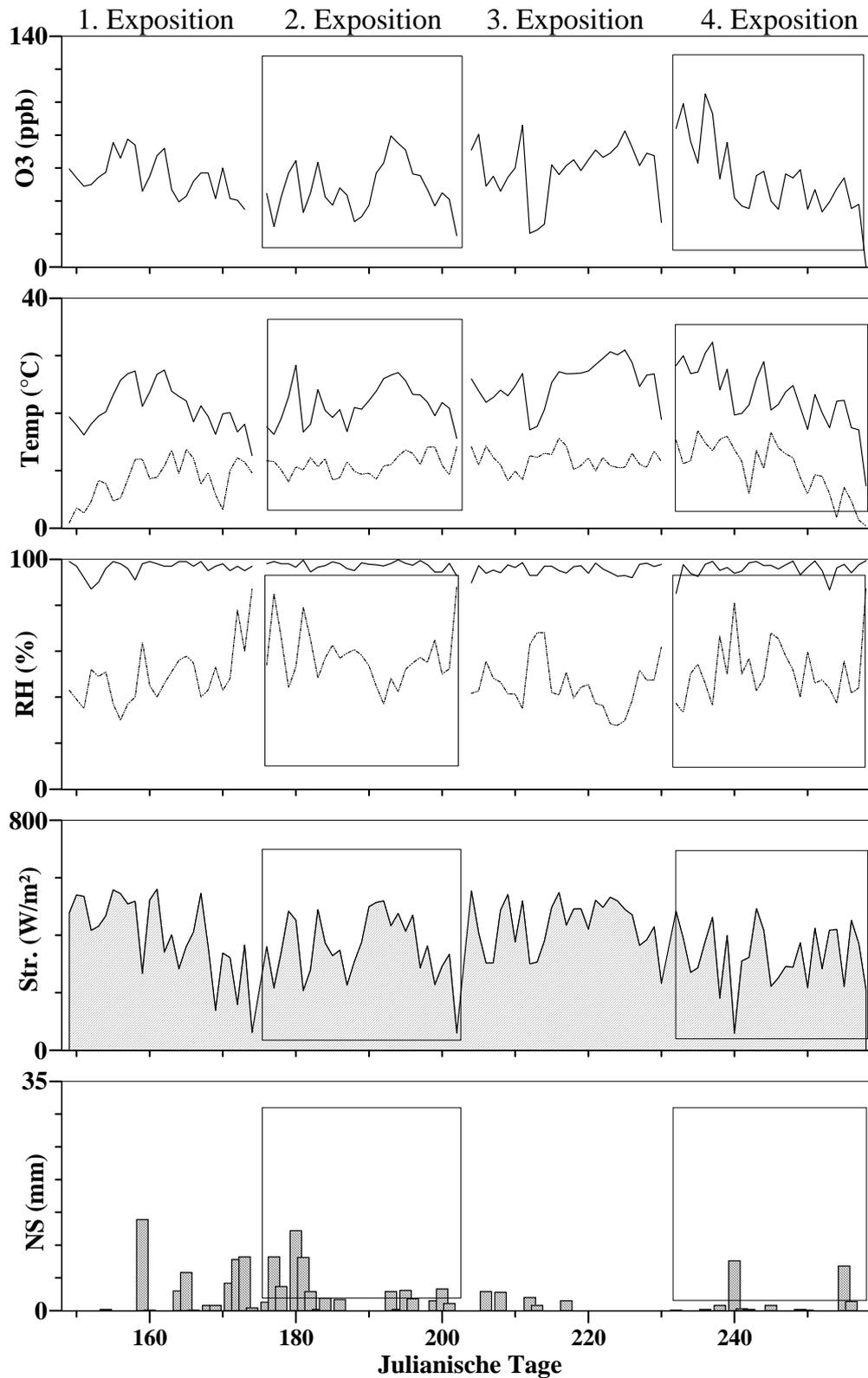


Abb. 74: Gemessene Tagesmittelwerte verschiedener Klimaparameter für jede Exposition des Jahres 1997

(O₃: Tagesmittelwerte der maximalen Ozonkonzentration; Temp: Tagesmittelwerte der minimalen und maximalen Temperatur; RH: Tagesmittelwerte der minimalen und maximalen relativen Luftfeuchtigkeit; Str: Tagesmittelwerte der Globalstrahlung (>50 W/m²); NS: Tagessummen der Niederschläge).

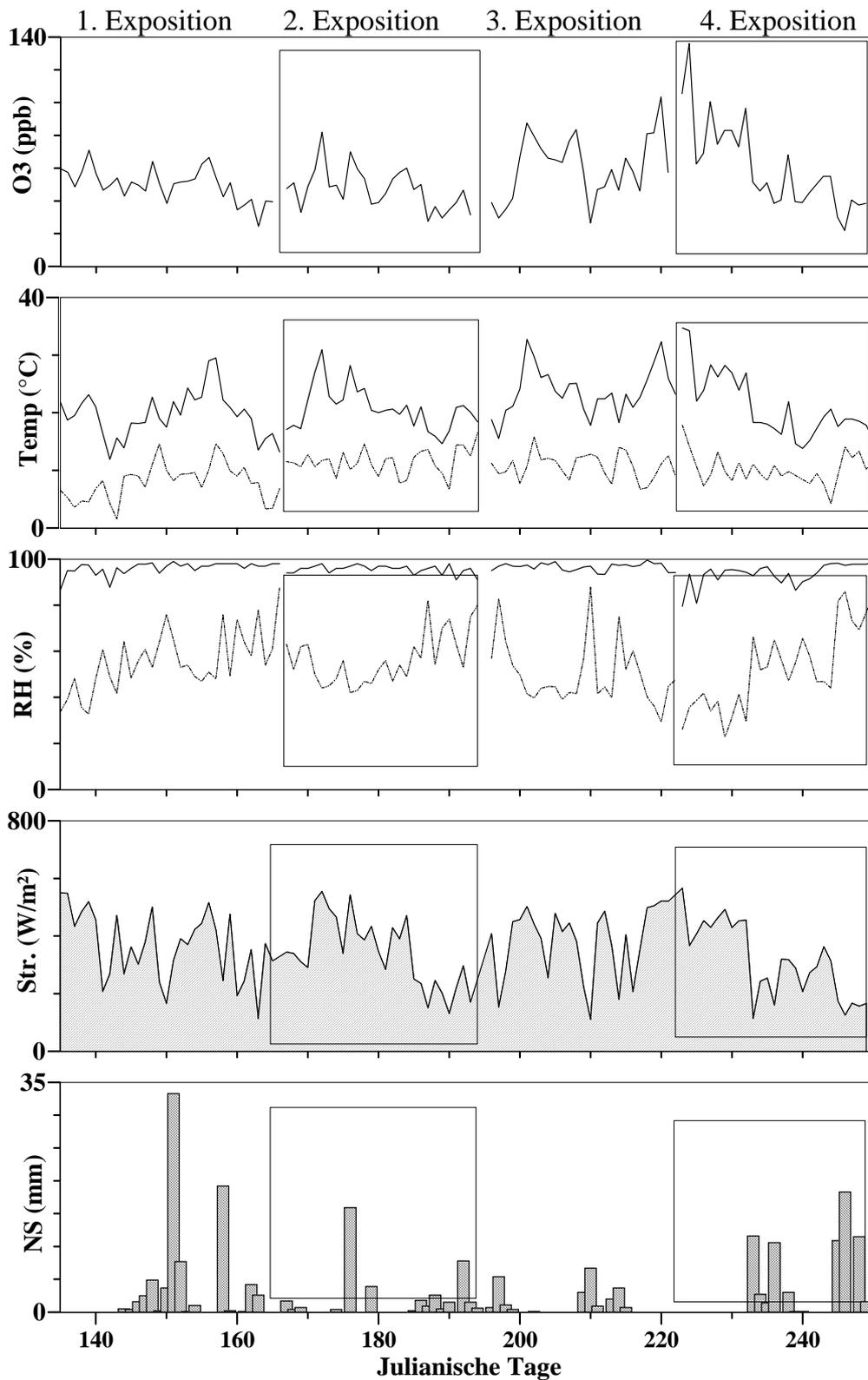


Abb. 75: Gemessene Tagesmittelwerte verschiedener Klimaparameter für jede Exposition des Jahres 1998

(O₃: Tagesmittelwerte der maximalen Ozonkonzentration; Temp: Tagesmittelwerte der minimalen und maximalen Temperatur; RH: Tagesmittelwerte der minimalen und maximalen relativen Luftfeuchtigkeit; Str: Tagesmittelwerte der Globalstrahlung (>50 W/m²); NS: Tagessummen der Niederschläge).

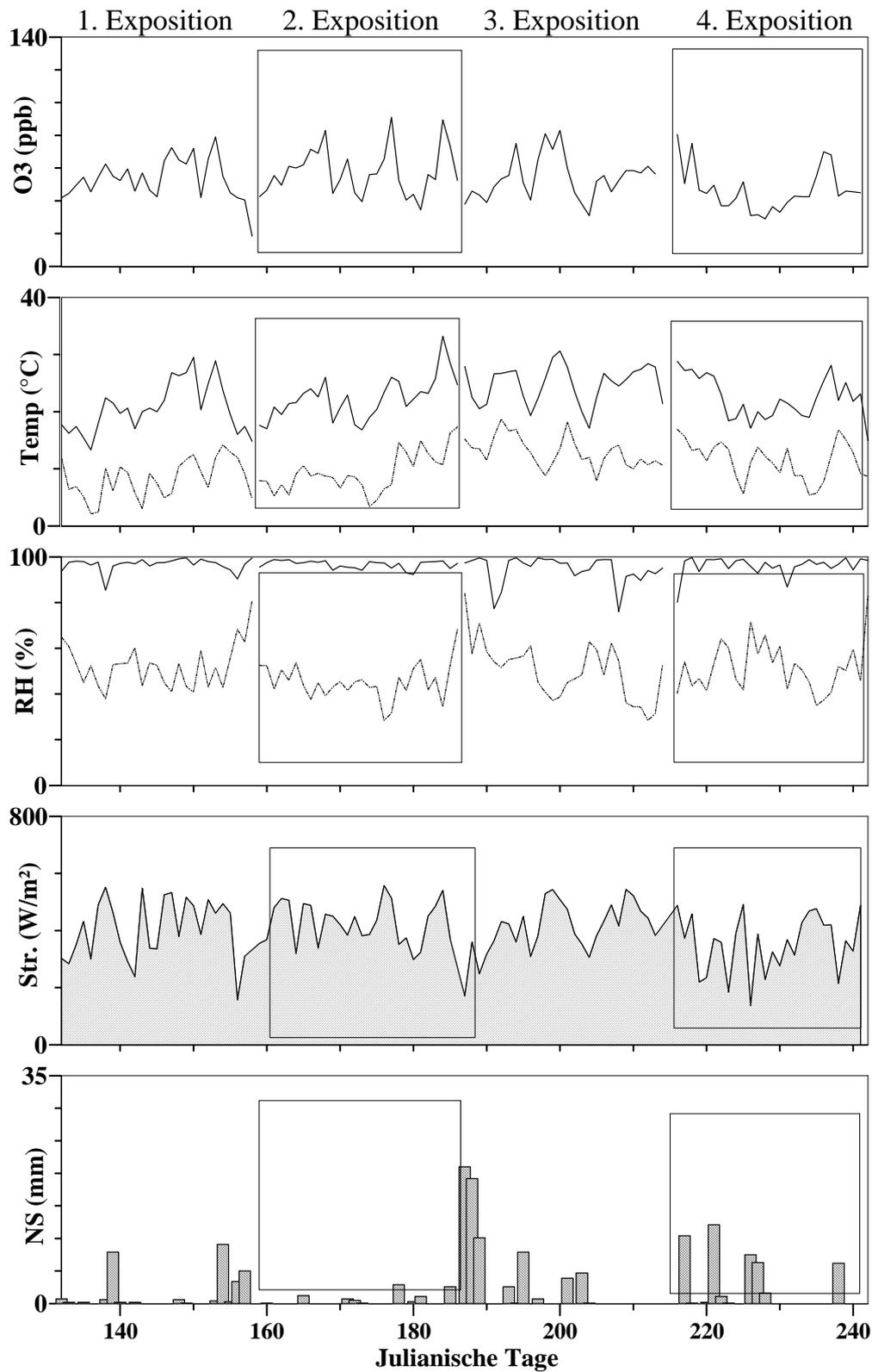


Abb. 76: Gemessene Tagesmittelwerte verschiedener Klimaparameter für jede Exposition des Jahres 1999

(O₃: Tagesmittelwerte der maximalen Ozonkonzentration; Temp: Tagesmittelwerte der minimalen und maximalen Temperatur; RH: Tagesmittelwerte der minimalen und maximalen relativen Luftfeuchtigkeit; Str: Tagesmittelwerte der Globalstrahlung (>50 W/m²); NS: Tagessummen der Niederschläge).

Anhang 2

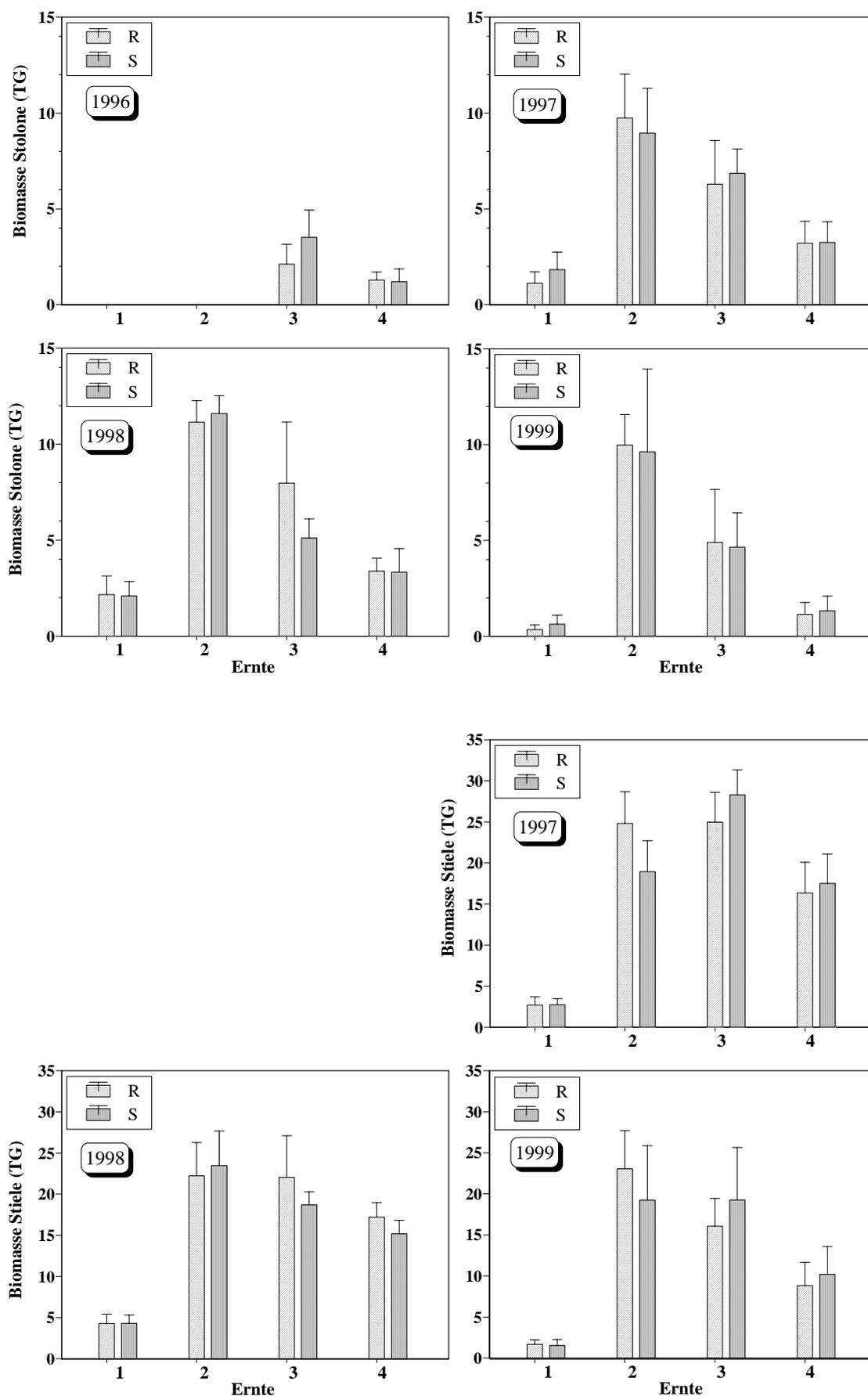


Abb. 77: Biomasse der Stolone und der Blattstiele im Freiland

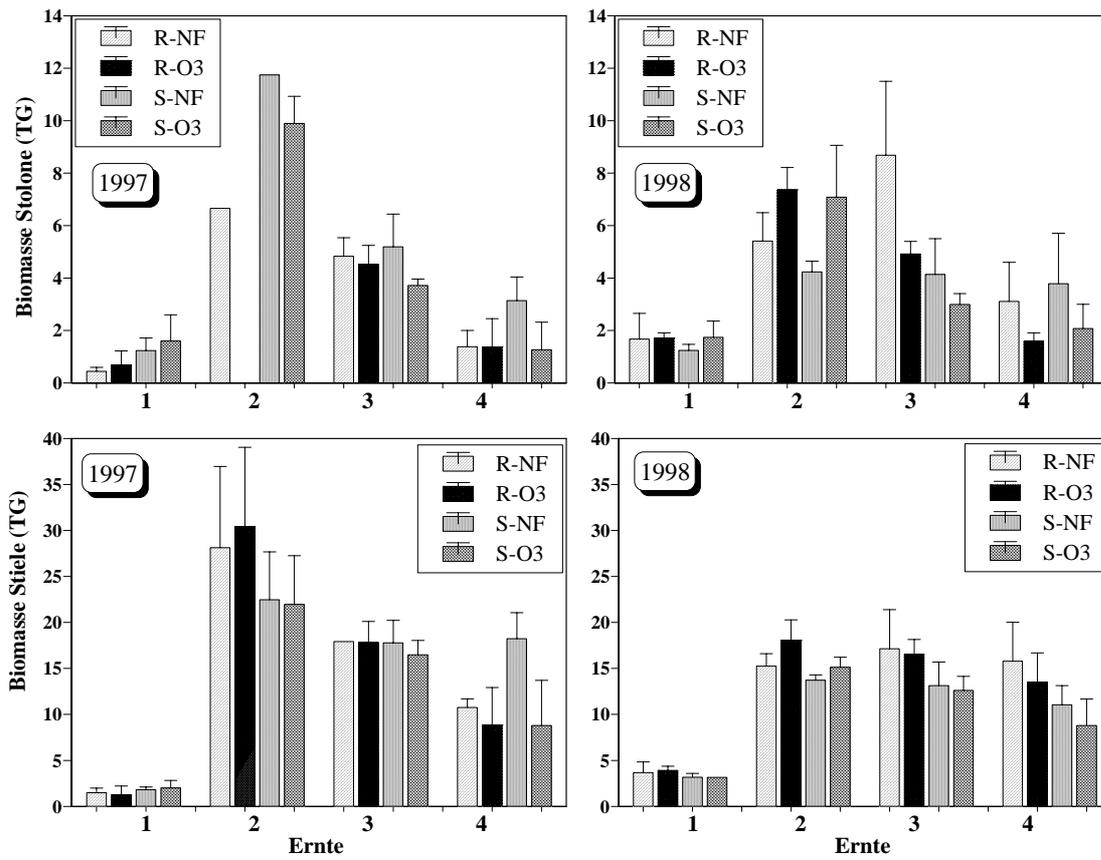


Abb. 78: Biomasse der Stolone und Stiele in den *open-top*-Kammern

(R-NF und S-NF: Kleeclonen in den Kontrollkammern; R-O₃ und S-O₃: Kleeclonen in den Behandlungskammern).

Anhang 3

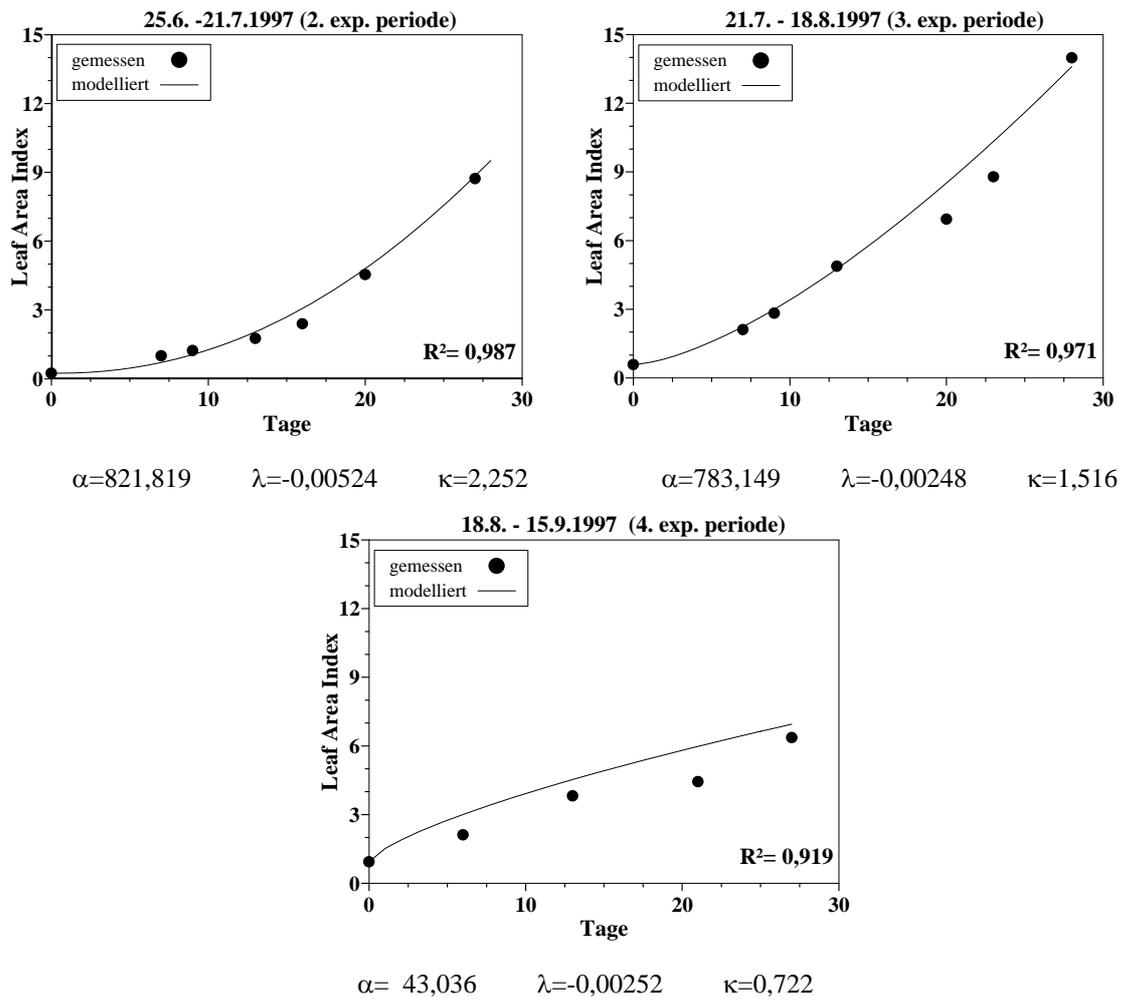


Abb. 79: Entwicklung des *Leaf Area Index* bei allen drei Expositionen des Jahres 1997

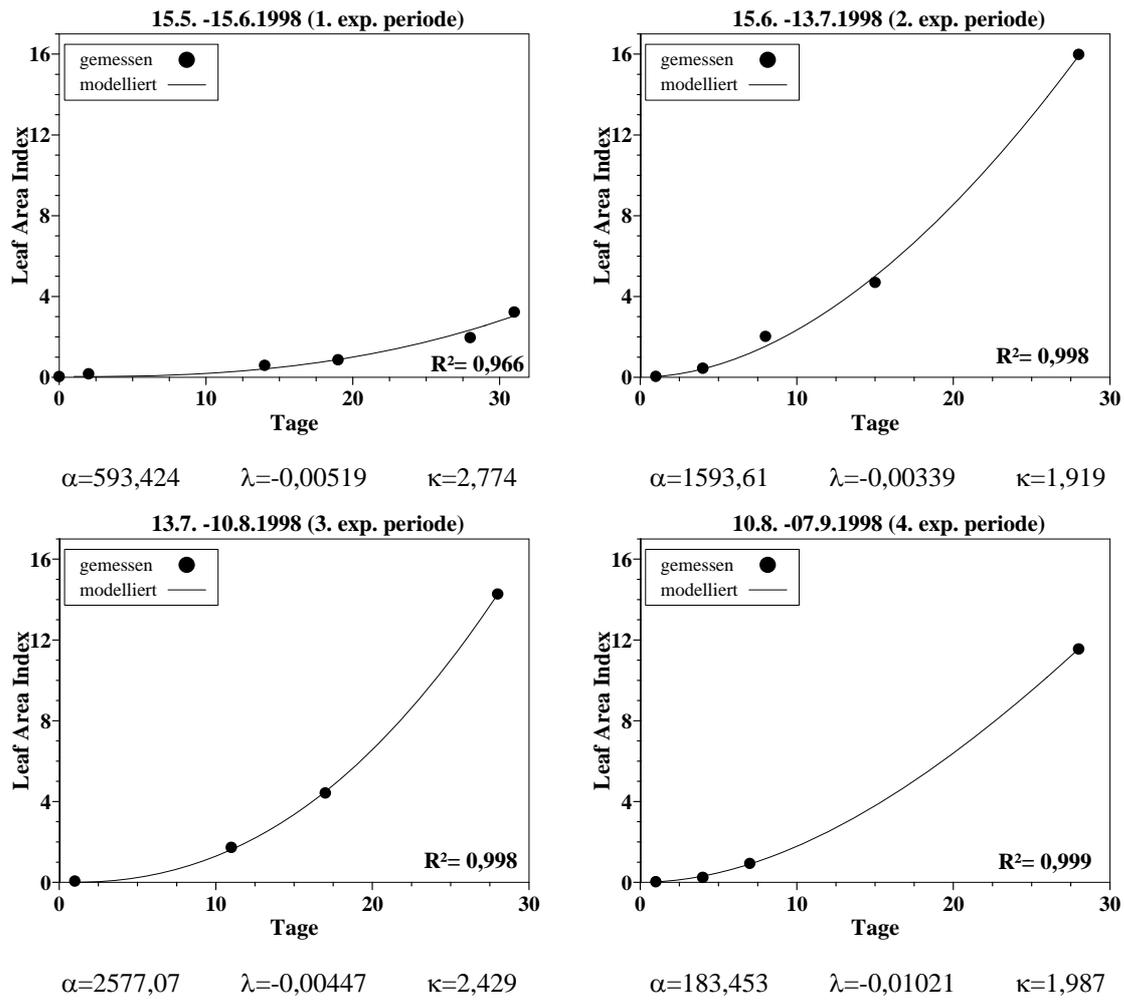


Abb. 80: Entwicklung des *Leaf Area Index* bei allen vier Expositionen des Jahres 1998

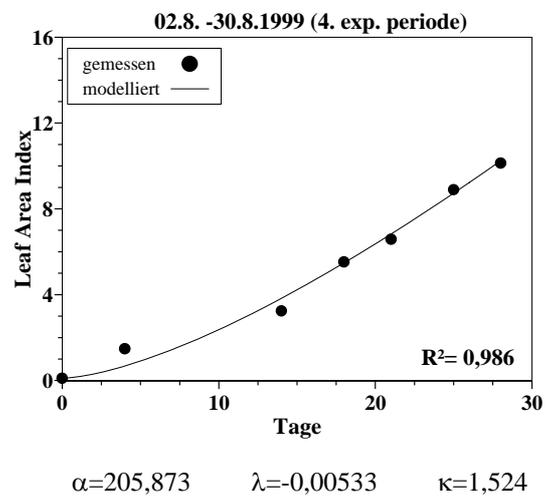
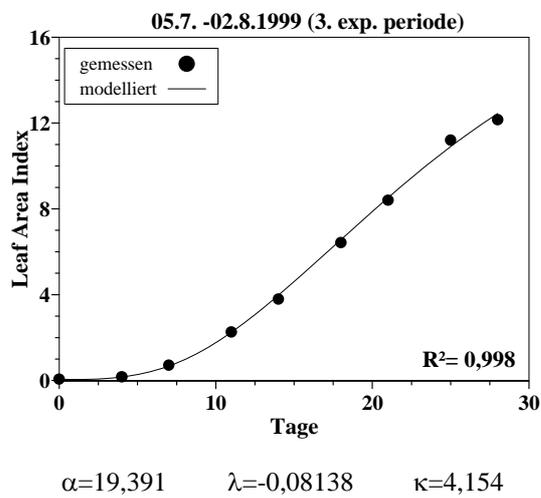
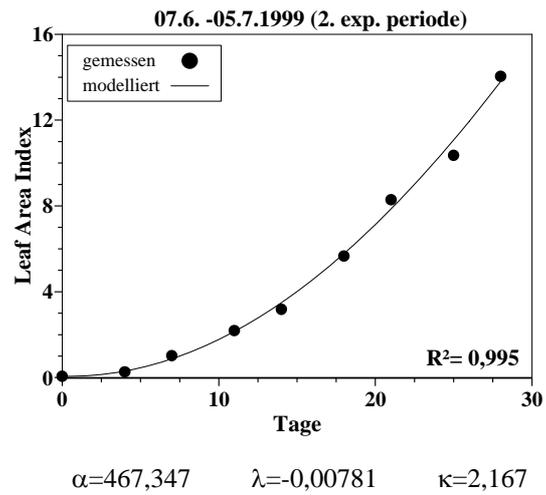
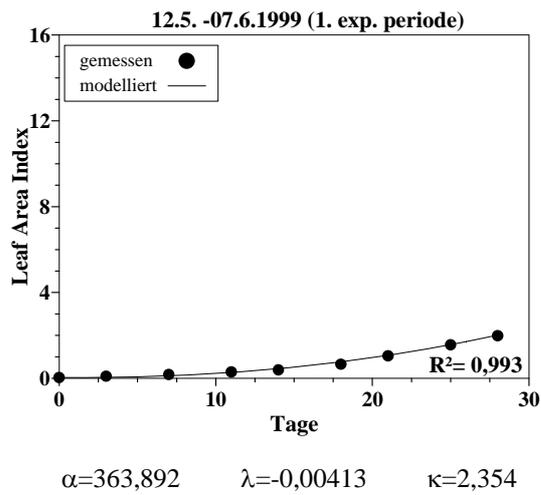


Abb. 81: Entwicklung des *Leaf Area Index* bei allen vier Expositionen des Jahres 1999

Anhang 4

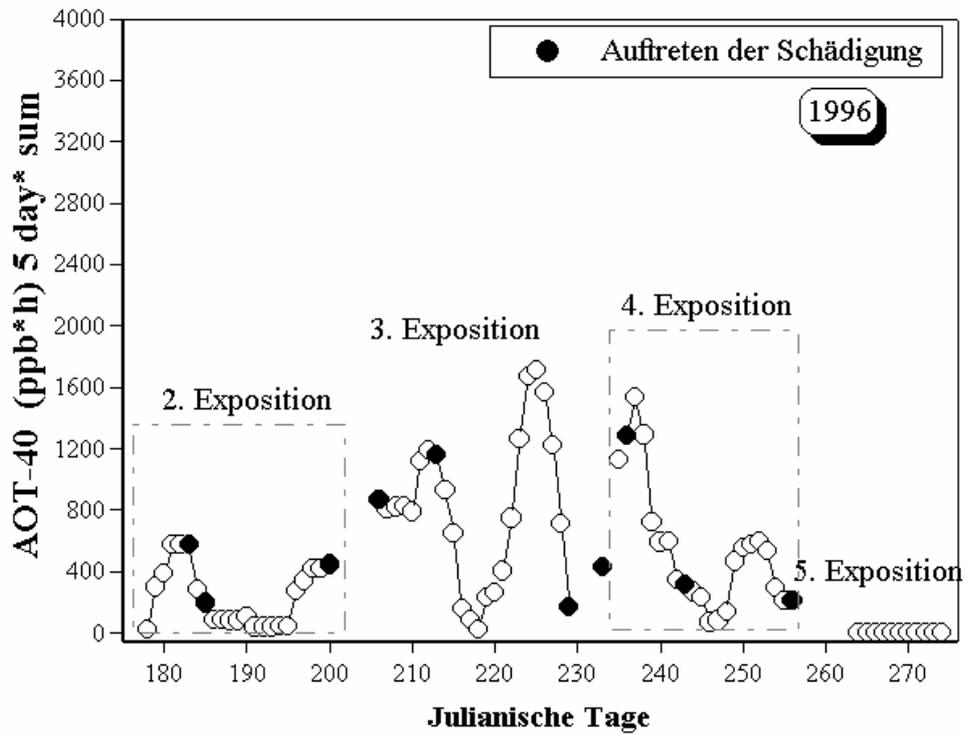


Abb. 82: Berechneter AOT40 Wert für das Jahr 1996

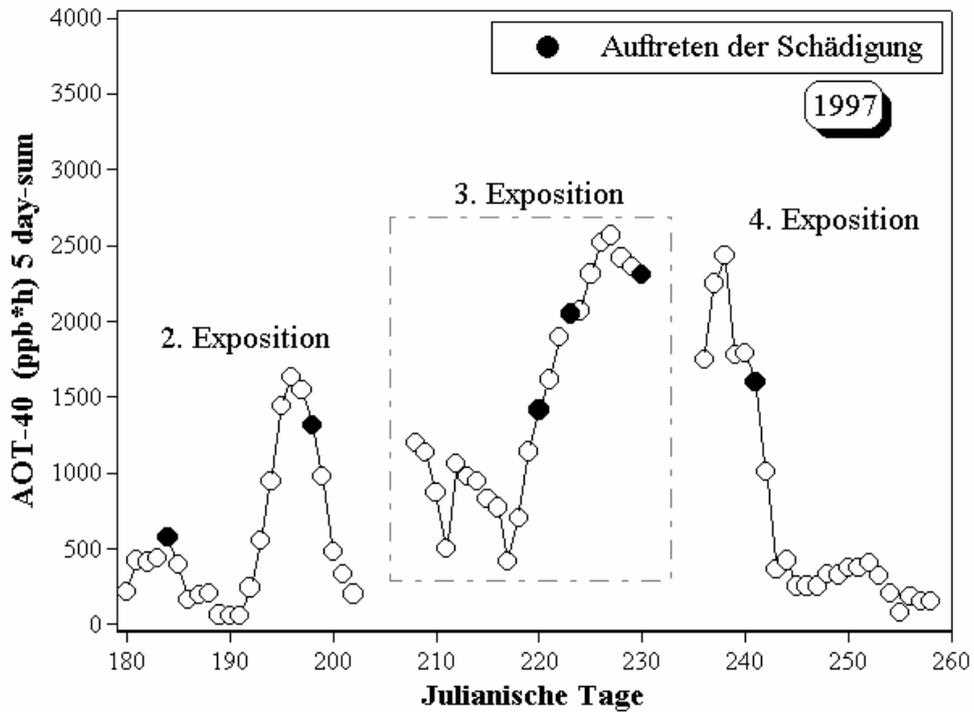


Abb. 83: Berechneter AOT40 Wert für das Jahr 1997

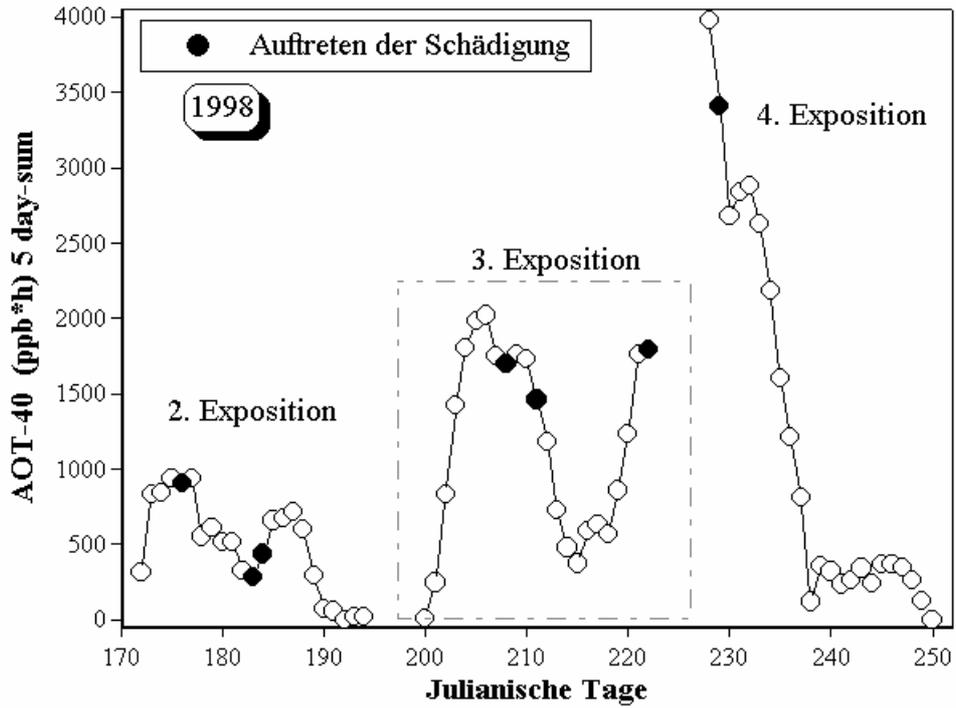


Abb. 84: Berechneter AOT40 Wert für das Jahr 1998

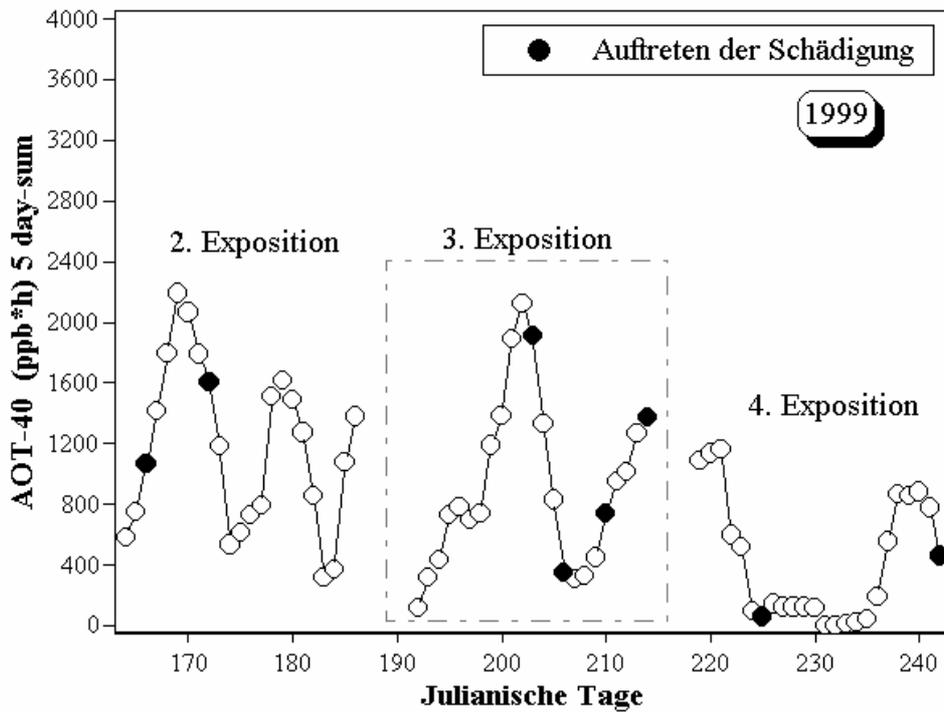


Abb. 85: Berechneter AOT40 Wert für das Jahr 1999

Tabelle 12: Vergleich der PAD und der AOT-Werte

Jahr	Tag des Jahres	PAD _{5 Tage}	Mittlere O ₃ Konzentration		AOT-40 _{5 Tage}
			in den 5 24h	in den 5 24h (wenn Str.> 50W/m ²)	
1996	183	285,7	23,43	32,34	577,5
	185	308,2	24,63	29,35	193
	200	420,2	23,93	33,6	443
	206	412,9	29,51	40,38	869,5
	213	368,6	24,46	38,38	1159
	229	323,6	19,88	29,09	167,5
	236	533,2	29,6	47,06	1284
	243	312,6	21,96	30,72	311,5
	256	227,4	15,97	28,04	208,5
1997	184	315	24,8	34,42	575,8
	198	360	27,1	40,87	1314
	220	565,2	31,32	42,99	1415
	223	624,3	34,01	49,37	2047
	230	610,7	33,45	52,18	2306
	241	380,3	26,5	43,22	1600
	1998	176	273,4	28,34	38,2
183	290,6	24,89	34,19	280,3	
184	312,7	26,47	35,98	437,8	
208	435,5	30,71	45,93	1695	
211	338,9	28,36	42,48	1460	
222	485,9	29,22	45,61	1793	
229	648,2	43,34	61,22	3405	
1999	166	463,9	26,83	39,48	1065
	172	526,2	33,84	44,91	1605
	203	496,7	33,21	47,73	1910
	206	383,7	25,47	34,14	348,5
	210	444,3	28,61	37,84	740,5
	214	498,1	30,68	44,28	1371
	225	296,5	19,52	28,5	57
	242	334,3	22,5	33,24	459,5

Anhang 5

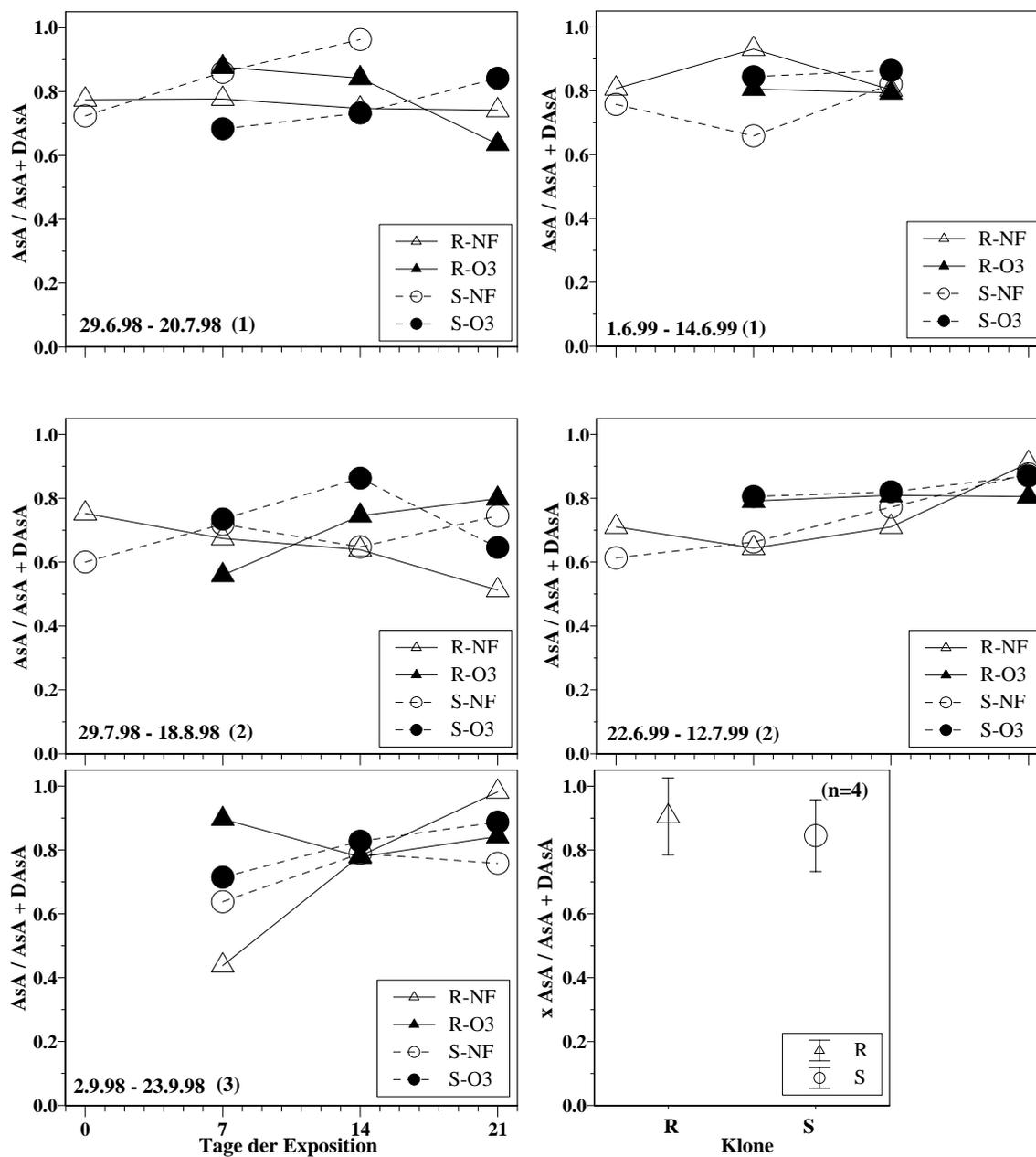


Abb. 86: Veränderung des Redoxstatus ($\text{Ascorbat}_{\text{red}}/\text{Ascorbat}_{\text{ges}}$) bei Gesamtblattmessung für die Jahre 1998 und 1999.

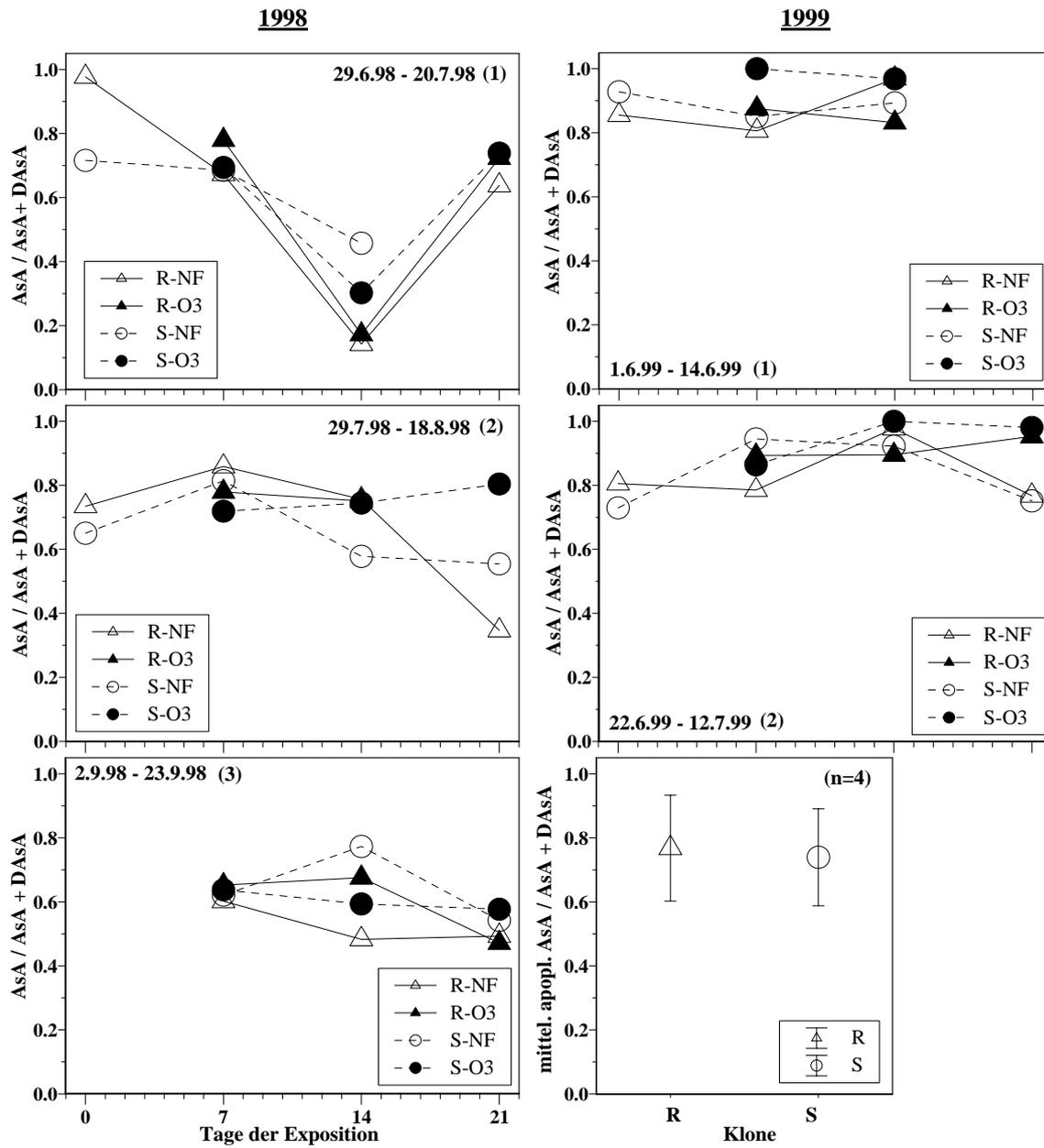


Abb. 87: Veränderung des apoplastischen Redoxstatus ($\text{Ascorbat}_{\text{red}}/\text{Ascorbat}_{\text{ges}}$) für die Jahre 1998 und 1999.