

**Ozoneeffekte auf  
unterschiedlich tolerante  
*Phaseolus vulgaris* Varietäten -  
das Ascorbat-Glutathion-System  
und die  
apoplastische Stressantwort**



Aus dem Institut für Pflanzenökologie  
Prof. Dr. Dr. h.c. H-J Jäger

und dem  
Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie  
Prof. Dr. E. Pahlich

Ozoneffekte auf unterschiedlich tolerante  
*Phaseolus vulgaris* Varietäten –  
das Ascorbat-Glutathion-System  
und die apoplastische Stressantwort

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaftlichen Fachbereiche (Biologie) der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
Dipl.-Biologin Heike Bräuning  
aus Buseck

Dekan des Fachbereiches 08  
(Biologie, Chemie und Geowissenschaften)  
Prof. Dr. J. Janek

1. Gutachter  
Prof. Dr. Dr. h.c. H-J Jäger

2. Gutachter  
Prof. Dr. E. Pahlich

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung .....	1
2	Material und Methoden .....	18
2.1	Geräte.....	18
2.2	Chemikalien und chem. Abkürzungen .....	18
2.3	Pflanzenmaterial .....	19
2.4	Ozonbehandlung.....	19
2.5	Biochemische Gesamtblattanalysen .....	20
2.5.1	Extraktgewinnung .....	20
2.5.1.1	Metaboliten .....	20
	(Ascorbat, Glutathion, NADP/H, NAD/H, Glucose-6-Phosphat)	
2.5.1.2	Enzyme .....	20
	(Ascorbatperoxidase, Dehydroascorbatreduktase, Glutathionreduktase, Peroxidase, Katalase, Malatdehydrogenase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase)	
2.5.1.3	Proteine .....	21
2.5.1.4	Chlorophylle/Karotinoide .....	21
2.5.1.5	Gesamt-Antioxidantienkapazität.....	21
	(NBT- <i>assay</i> , DPPH- <i>assay</i> )	
2.5.2	Messungen .....	22
2.5.2.1	Metaboliten .....	22
2.5.2.2	Enzyme .....	24
2.5.2.3	Berechnung .....	26
2.5.2.4	Proteine .....	27
2.5.2.5	Chlorophylle/Karotinoide .....	27

2.5.2.6	Gesamt-Antioxidantienkapazitäten ..... 27 (NBT- <i>assay</i> , DPPH- <i>assay</i> )	27
2.6	Chloroplasten- und Protoplastenisolierungen .....	28
2.6.1	Chloroplasten .....	28
2.6.2	Protoplasten .....	29
2.7	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	29
2.8	Apoplastenfluidgewinnung und biochemische Analyse .....	30
2.9	Radikalnachweis im Apoplasten .....	30
3	Ergebnisse .....	32
3.1	Sichtbare Ozonschäden; ein Varietäten- vergleich bei unterschiedlichen Ozonkonzentrationen .....	32
3.2	Gesamtblattanalysen .....	37
3.2.1	Metaboliten .....	37
3.2.2	Enzyme.....	44
3.2.3	Proteine .....	49
3.2.4	Chlorophylle/Karotinoide .....	49
3.2.5	Gesamt-Antioxidantienkapazitäten.....	52
3.3	Chloroplasten- und Protoplastenisolierungen .....	55
3.3.1	Chloroplasten .....	55
3.3.2	Protoplasten .....	57
3.4	Rasterelektronenmikroskopie.....	58

3.5	Apoplastenfluidgewinnung und –analysen .....	60
3.5.1	Metaboliten .....	60
3.5.2	Enzyme.....	65
3.5.3	Proteine .....	67
3.6	Radikale im Apoplasten .....	68
4	Diskussion.....	69
4.1	Das antioxidative Ascorbat-Glutathion-System: Stabilität, Plastizität, Labilität .....	69
4.2	Einordnung von <i>Phaseolus</i> in die allgemeine Terminologie .....	70
4.3	Seneszenzerscheinungen unter Ozoneinfluss.....	71
4.4	Biochemische Gesamtblattanalysen des antioxidativen Systems .....	73
4.4.1	Analyse nicht-enzymatischer Bestandteile .....	73
4.4.2	Analyse enzymatischer Bestandteile .....	79
4.5	Analyse einzelner Kompartimente .....	84
4.5.1	Chloroplasten .....	84
4.5.2	Apoplast .....	85 (Radikale und Antioxidantien im Apoplast)
4.6	Vergleich Gesamtblattextrakt und Apoplastenfluid .....	92
5	Zusammenfassung .....	94
6	Literaturverzeichnis .....	95

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Ozon, ein dreiatomiges, gewinkelt gebautes Sauerstoffmolekül (Abb. 1), ist zugleich **lebenswichtiger** Atmosphärenbestandteil ( $1-3 \cdot 10^{-6}$  Volumen-%) als auch **lebensbedrohender** Schadstoff. Die öffentliche Diskussion liefert Stichworte wie „Ozonloch“ (starke Ausdünnungen der Ozonschicht der Stratosphäre) und „Sommersmog“ (unerwünscht hohe Ozonwerte in den unteren Luftschichten der Troposphäre) und stellt die Frage nach Grenzwerten, bzw. Schwellenwerten und Indikationsmöglichkeiten, d.h. dem Einsatz höherer Pflanzen als „Monitororganismen“ zur Erfassung von Verunreinigungen. Der Vielzahl der offenen Fragen versucht die wissenschaftliche Forschung Rechnung zu tragen.

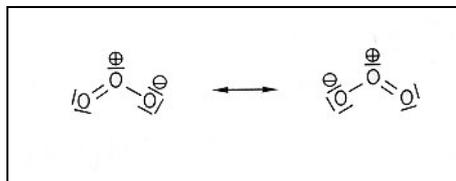


Abb. 1: Mesomere Grenzformeln zur Darstellung von Ozon

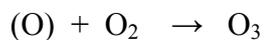
## a) Ozon als Luftbestandteil und Schadgas

Weder M. von Marum, der erstmals 1785 den eigenartigen Geruch eines Gases in der Nähe von „*Elektrisiermaschinen*“ feststellte, noch C.F. Schönbein, der dem Gas 1839 nach dem griechischen **ozon = „das Riechende“** den Namen gab, konnten die Bedeutung des von ihnen entdeckten Stoffes in der wissenschaftlichen Forschung und im alltäglichen Leben zukünftiger Zeit erahnen. 1865 wurde von J.L. Soret die chemische Zusammensetzung gefunden (Röth 1994). Weitere Untersuchungen Anfang des 19. Jh. lieferten die Erkenntnis einer vertikalen Ozonverteilung und des Vorhandenseins einer „**Ozonschicht**“ in höheren Atmosphärenregionen. 90 % des Ozons ist in der Stratosphäre und 10 % in der Troposphäre lokalisiert (Zellner 1991). Die phytotoxischen Effekte von Ozon wurden (erst) 1958 erkannt (Rao, Davis 1999). Nochmals mehr als 10 Jahre mussten vergehen, bis 1971 die Phase der Diskussion über eine anthropogene Einwirkung auf die Ozonschicht begann und sich als Folge allmählich die Erkenntnis (Einsicht?) durchsetzte, dass Chlor- und Bromverbindungen ein Kernproblem der anthropogenen Beeinflussung der schützenden Ozonschicht darstellen. Die Entdeckung des „**Ozonlochs**“ über der Antarktis induzierte die Zusammenarbeit unterschiedlicher interdisziplinärer Wissenschaften (Salawitch 1998; Bittner et al. 1998).

Die Aufmerksamkeit der Wissenschaft wurde vergleichsweise spät auf die Untersuchung der **Ozonchemie in der Troposphäre** gelenkt. Smogepisoden, Forstschäden und verminderte Ernten bis hin zu Ernteaussfällen (Manning, Tiedemann 1995; Pell et al. 1997; Heath, Taylor 1997; Polle et al. 1995; Lyons et al. 1999) führten zu einem gesteigerten Interesse dieses Aspekts der Wissenschaft. Kontinuierlich stieg die Konzentration des Ozons in der Troposphäre über die Jahre an. Immer mehr ins Zentrum wissenschaftlicher Untersuchungen rückt(e) die „Antwort“ der Organismen auf das Ozon,

ihre Fähigkeit zu **reagieren**, zu **entgiften** und zu **überleben** (Polle et al. 1990; Weber et al. 1994; Sandermann 1996; Wellburn, Wellburn 1996; Schraudner et al. 1997; Sharma, Davis 1997; Obinger et al. 1998; Moldau 1999; Burkey et al. 2000; Pasqualini et al. 2001).

In der Stratosphäre entsteht Ozon durch die hohe Strahlungsintensität über die Spaltung der dort vorkommenden Sauerstoffmoleküle ( $O_2$ ) in einzelne Sauerstoffatome mit anschließender Addition dieser Atome an noch vorhandene Moleküle. **Troposphärisches Ozon** wird zum Einen durch Luftaustausch zwischen den Luftschichten aus der Stratosphäre eingetragen und entsteht zum Anderen durch **photochemische Oxidation** neu. Hierbei zerfällt unter Einfluss und Abhängigkeit der Strahlungsintensität Stickstoffdioxid ( $NO_2$ ) zu Stickstoffmonoxid (NO) und reaktivem atomarem Sauerstoff (O). Letzterer reagiert mit molekularem Luftsauerstoff zu Ozon.



Da Stickstoffmonoxid vorhandenes Ozon abbauen kann, bestimmt das Verhältnis der Konzentrationen  $NO_2$  und NO zueinander, welche der beiden Reaktionen überwiegt (Elstner 1990).

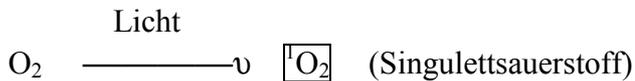
Die **Toxizität des Ozons** gründet in der zerstörerischen Wirkung des Moleküls durch seine **Oxidationsfähigkeit**. Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang verschiedene Untersuchungen, die zeigen, dass Luftschadstoffe wie Ozon einen sog. „**oxidativen Stress**“ auslösen (Sharma, Davis 1994; Wellburn et al. 1994; Pell et al. 1997). Oxidativer Stress wird definiert als *imbalance* zwischen dem Schutz vor freien Radikalen und ihrer Generation (Desmarchelier et al. 1997). Bereits unter „Normalbedingungen“ ist infolge der Präsenz von Sauerstoff im Zellmilieu eine „stetige oxidative Bedrohung der zellulären Strukturen und Prozesse“ vorhanden (Alscher et al. 1997). Die resultierende Entstehung von „**reaktiven, toxischen Sauerstoffspezies**“ (*reactive oxygen species* = ROS oder *activate oxygen species* = AOS) wird vielfach beschrieben (Salin 1987; Smirnov 1993; Elstner, Oswald 1994; Hippeli, Elstner 1996). Erhöht sich die Belastung von Pflanzen durch biotische und abiotische „Stressfaktoren“, kann dies zu einem Anstieg der ROS-Konzentrationen und somit zu einer verstärkten Schädigungsgefahr für die Zelle führen. Das wurde unter anderem am Beispiel von Kältestress gezeigt (Hodges et al. 1996; Tao et al. 1998), bei dem eine Zunahme des Superoxidradikals nachgewiesen werden kann (Foyer et al. 1997). Erhöhte ROS-Konzentrationen finden sich auch nach Salzstress (Burdon et al. 1996), Hitzestress (Edreva 1998), Pathogenattacken (Chamnongpol et al. 1998), Schwermetallbelastung (Rucinska et al. 1999) und „Saurem Regen“ (Velikova et al. 2000).

Daher müssen im Rahmen der Untersuchung von Ozon-Auswirkungen als Verursacher von Schadbildern an Pflanzen neben dem Ozonmolekül selbst auch seine Folgeprodukte (Superoxidation, Hydroperoxyradikal, Hydroxylradikal, Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid) in die Überlegungen mit einbezogen werden.

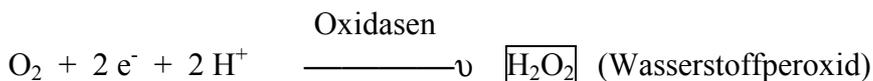
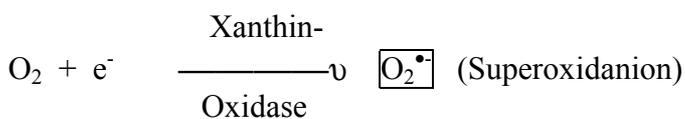
## b) Entstehung und Nachweismöglichkeiten von ROS

Die **Biochemie der ROS-Entstehung** wurde intensiv erforscht. Folgende Reaktionen werden hierbei beschrieben (Elstner 1990):

a) physikalische Sauerstoffaktivierung durch Energietransfer



b) chemische Sauerstoffaktivierung durch Reduktion



Gemeinsamkeiten der ROS sind ihre **Instabilität** und ihre **minimalen Konzentrationen**. Daraus resultieren die Schwierigkeiten, ROS *in vivo* direkt nachzuweisen und vor allem zu quantifizieren. Für das in diesem Zusammenhang als stabilste Sauerstoffverbindung anzusprechende  $\text{H}_2\text{O}_2$  stehen **Detektionsmethoden** mittels Fluoreszenzfarbstoffen zur Verfügung (Lu, Higgins 1998; Cazalé et al. 1998). Eine weitere Nachweismethode für ROS ist die Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR). Erste Versuche an Pflanzen in dieser Richtung wurden 1990 veröffentlicht (Mehlhorn et al. 1990). Der Einsatz von *spin-traps* (Radikal-“Fängern“) kompensiert hierbei die niedrigen ROS-Konzentrationen. In biologischen Systemen ist ihr Einsatz jedoch problematisch (Toxizität, enzymatische und chemische Reduktionen, Spezifität des *spin-traps* und Unsicherheiten bei der Identifizierbarkeit der Signale sind einige der genannten Probleme; Czapski 1984; Pou et al. 1989; Mehlhorn et al. 1990; Mason, Knecht 1994). ESR-Messungen radikalischer Sauerstoffspezies werden *in vivo* hauptsächlich an isolierten Organellen bzw. Kompartimentteilen (z.B. Thylakoidmembranen → Hideg et al. 1994; Kalai et al. 1998; Membransystemen → Golovina et al. 1997, Zellextrakten → Leprince et al. 1994) angewendet.

Für Blattuntersuchungen wurden Injektionsmethoden eingesetzt (Lu, Higgins 1998). Die Oxidation des Farbstoffs Phenolrot mit anschließender photometrischer Quantifizierung wurde für die Detektion von ROS in Apoplastenfluid beschrieben (Schraudner et al. 1998). Überwiegend werden die Radikale indirekt über die Messung von Malondialdehyd (MDA), einem Produkt der Lipidperoxidation (Mackerness et al. 1999), oder über den Proteinabbau als Anzeichen eines oxidativen Stresses (Pacifci, Davies 1990) bestimmt. Ähnlich arbeiten die sog. Antioxidantien-*assays*. Anhand dieser *assays* können Rückschlüsse auf die ROS-Menge gezogen werden und dadurch die „Gesamt-Abwehrleistung“ einer Pflanze eingeschätzt werden (Miller, Rice-Evans 1996; Løvaas, Olsen 1998).

### c) Primäres Reaktionskompartiment von Ozon und ROS

Nach dem Passieren der Stomata löst sich das Ozon in der wässrigen Phase des **Apoplasten** und generiert hier die ROS (Wellburn et al. 1994; Moldau 1998). Die Aufnahme von Ozon durch die Stomata ist um den Faktor  $10^4$  größer als die kutikuläre Absorption (Günthardt-Georg et al. 1997). Hat Ozon den Interzellularraum erreicht, wird es schnell vom umgebenden Milieu aufgenommen, so dass die zu messende Ozonkonzentration im Luftraum des Blattinneren annähernd Null ist (Laisk et al. 1989). Als primäres Reaktionskompartiment sowohl von **Ozon** als auch der meisten Pathogene (und ihrer Folgeprodukte) wird der Apoplast beschrieben (Elstner, Osswald 1994; Sakurai 1998; Hoson 1998). Andere Stressoren wie  $\text{SO}_2$ , photodynamische Herbizide und Lichtstress wirken dagegen im Chloroplasten (Larcher 1994). Der Apoplast (gr. *plastós* = geformt) ist definiert als „extraprotoplastische Matrix der Zelle inklusive Zellwand“ (Dietz 1997). Das bedeutet, dass der Apoplast aus a) der extrazellulären Matrix, die der Stabilisierung der Struktur dient, b) der sog. „flüssigen Schnittstelle zwischen den interzellulären Gasräumen“ (Vanacker et al. 1998a) und c) der Plasmamembran besteht. In Relation zum Gesamtvolumen wird das Volumen des Apoplasten mit 10 % angenommen (Sakurai 1998). Geprägt wurde der Begriff „Apoplast“ von dem deutschen Wissenschaftler E. Münch 1930, wobei er den „Wasserweg“ Apoplast und den „anderen Teil der Zelle“ als Symplast definierte. Der heutige Stand der Forschung weist dem Apoplasten einen weitaus komplexeren **Aufgabenbereich** zu (Sakurai 1998). Zu diesen zählen: Wachstumsregulation ( $\beta$ -Glucan, Callose, Expansin, Pectin, Cellulose, Glucanasen, Peroxidasen, etc.), Stützfunktion (Cellulose, Lignin, Synthasen, Peroxidasen, etc.), Abwehrfunktionen/-reaktionen (Cutin, etc. → Austrocknung; Chitin, Pectin,  $\beta$ -Glucan, Chitinasen, etc. → Pathogene; Ascorbat, Ascorbatperoxidase, Peroxidasen, etc. → Luftschadstoffe), Transportraum (Wasser, Ionen, Zucker, Invertasen, Hydrolasen, etc.), Aufrechterhaltung der interzellulären Homöostase (Ionenbalance, pH-Wert, Wassergehalt), Zell-Zell-Adhäsionen (Arabinogalactan, Transferasen, etc.), Funktion als Luftraum (Austausch mit der Umgebung,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ).

### d) Allgemeine Schadwirkungen pflanzentoxischer Gase

Fragen bezüglich des Folgegeschehens der Schadstoffeinwirkung sind im Detail noch nicht vollständig zu beantworten. Als **Effekte pflanzentoxischer Gase** können häufig **makroskopisch** morphologische Veränderungen wie Zwergwuchs, Verkrüppelungen,

Verkrebsungen, Verkrümmungen, Blattepinastien (= autonome Krümmungsbewegungen durch Wachstumsförderung der Blattoberseite), Verfärbungen, Chlorosen (= durch Verringerung des Chlorophyllgehaltes verursachte Veränderungen der Blattfärbung), Nekrosen (= lokal begrenztes Absterben pflanzlicher Zellen und Gewebe, durch Braunfärbung sichtbar) als frühe Symptome verzeichnet werden (Sharma, Davis 1994; Manning, Tiedemann 1995). In der Literatur werden auch sog. „Wasserflecken“ (*water logging*) in Blättern beschrieben, die sich später in Nekrosen umwandeln (Heggstad 1991; Schraudner et al. 1996). Dem gegenübergestellt werden **mikroskopische** Verletzungen, die als unterschwellige Effekte bezeichnet werden. Wachstums-, Ertrags- und Populationsveränderungen, z.B. über den Abbau oder die Schädigung von Resistenzfaktoren, können damit einhergehen.

Eine weitere Einteilung kann in Bezug auf die sichtbaren Effekte getroffen werden. Nach kurzzeitigen Belastungen mit einer hohen Toxindosis treten akute Symptome auf. Dies geschieht häufig schon 24-48 h nach Beginn der Schadeinwirkung. Dem gegenüber werden chronische Symptome auf Langzeitbelastungen mit niedrigen Toxingaben zurückgeführt. Nicht immer ist in diesem Fall die eindeutige Zuordnung des Effekts zum Auslöser möglich, da andere pathologische Erscheinungen zu ähnlichen Schadbildern führen/führen können.

In einigen Beispielen lassen charakteristische Verfärbungen Schlussfolgerungen auf die der Schädigung zugrunde liegenden Schadmechanismen und somit auf das auslösende Toxin zu (z.B. weist die Bleichung aller Pigmente auf SO<sub>2</sub>-Belastung und eine Vergilbung auf NH<sub>3</sub>-Einwirkung hin; Larcher 1994). Typisch für Ozoneinwirkungen sind verfärbte Kleinzonen, sog. Farbtupfen (auch tüpfelförmige Läsionen) oder im Englischen *stiplings* (Günthardt-Georg 1997).

**Chronische Schäden** zeichnen sich aus durch langsam voranschreitende Chlorosen, Seneszenzerscheinungen (Vergilben, Welke, Abszission der Blätter), reduzierte Photosyntheserate, veränderte Enzymaktivitäten und Metabolitenpools, Abnahme der Blattfläche, verringerte Wassernutzungseffizienz und damit verbunden reduzierte Biomasseproduktion sowie reduzierten Ertrag (Castillo, Greppin 1988; Luwe et al. 1993; Manning, Tiedemann 1995; Yun, Laurence 1999; Jin et al. 2001; Leipner et al. 2001). Die Beispiele machen deutlich, dass diese Erscheinungen nicht für bestimmte Toxine charakteristisch sind und es deshalb leicht zu Verwechslungen kommen kann (Sandermann 1996).

Ergänzend muss erwähnt werden, dass an natürlichen Standorten selten/nie eine Noxe alleine auf die Pflanzen einwirkt, fast immer liegen Kombinationen unterschiedlicher Zusammensetzung vor. Die **Interaktion** der einzelnen Komponenten kann additiv (die Wirkung entspricht der Summe der Einzelwirkungen), synergistisch (die Wirkung ist größer als die Summe der Einzelwirkungen) oder antagonistisch sein (die Wirkung ist geringer als die Summe der Einzelwirkungen; Brunold et al. 1996).

Auf Seiten der Pflanze ist ein Phänomen zu beobachten, das **cross-adaption** genannt wird. Es bezeichnet die Fähigkeit, durch die Applikation eines „Stressors“ Toleranz auch gegenüber einem/mehreren anderen „Stressor/en“ zu erzeugen. Bekanntes Beispiel ist die Antwort von Pflanzen auf Kälte- bzw. Wasserstress. Für beide wird ein gemeinsamer Dehydrations-Mechanismus vermutet, basierend auf der – durch beide „Stressoren“ ausgelösten – Expression von Dehydrations-induzierten „Stress-Proteinen“ (Arora et al. 1998). Die Ähnlichkeit zwischen Ozon-induziertem Zelltod und Pathogen-induzierter *hypersensitive response* ist ein weiteres Beispiel (Schraudner et al. 1996; Rao, Davis 1999).

## e) Spezielle Schädwirkungen von Ozon und seinen Folgeprodukten

Für die **Ozontoxizität** kann kein genereller, alleinverantwortlicher **Mechanismus** erwartet werden. Dies erklärt sich aus der ROS-Entstehungs- und -Wirkungsspezifität. Deshalb sind auch die pflanzlichen Abwehrstrategien sehr komplex und werden über eine Vielzahl verschiedener Regulatoren moduliert (Polidoris, Scandalios 1999).

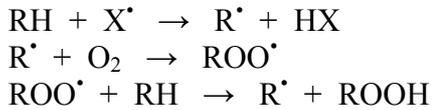
Neben den sichtbaren Symptomen (Chlorosen, Nekrosen, Wasserflecken) verursacht Ozon wie schon allgemein für phytotoxische Gase erwähnt, eine Reihe weiterer Schäden (Kangasjärvi et al. 1994). Da Ozon kein Bestandteil des Stoffwechsels der Pflanzenzelle ist, sind Störungen dieses Stoffwechsels unausweichlich. Häufig genannt und untersucht sind die Änderungen in den Photosyntheseraten bei verschiedenen Pflanzenarten. Diese resultieren einerseits in einer verminderten Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase- (*RubisCO*)-Aktivität sowie andererseits in einer reduzierten stomatären *conductance* (Pell et al. 1990). Bleichungsreaktionen können aufgrund von Pigmentverlusten durch Zerstörung der Pigmente (u.a. durch Singulett-Sauerstoff) erklärt werden. Auch im Proteinmetabolismus (bei Inaktivierungen von Proteinen; Mudd 1997) und beim Lipidstoffwechsel kann es zu Abweichungen kommen. Die Möglichkeit der Geninduktion durch Ozon wird diskutiert. Für unterschiedliche Pflanzen konnten u.a. Anstiege der mRNA-Level für *pathogenesis-related-proteins* ( $\beta$ -1,3-Glucanase und Chitinase), sowie für Glutathion-Transferase, Phenylalaninammoniumlyase, Superoxid-dismutase und Peroxidasen gezeigt werden. Umgekehrt wird für die kleine und große Untereinheit der *RubisCO* eine Verringerung des mRNA-Levels beschrieben (Sharma, Davis 1994, Eckey-Kaltenbach et al. 1994; Kangasjärvi et al. 1994; Conklin, Last 1995).

Aus Sicht der pflanzlichen „Reaktionsfähigkeit“ sind Kurzzeitbegasungen mit hohen Ozondosen schwerwiegender als Langzeiteinwirkungen mit niedrigen Ozonkonzentrationen (Yun, Laurence 1999). Eine Sonderform der pflanzlichen Ozonantwort stellt der bei Bäumen beobachtete *memory effect* dar (Sandermann 1996).

Gemäß der externen Herkunft des Ozons sind besonders die zellulären Membranen erstes Ziel und Hauptangriffspunkt des Luftschadstoffes (Heath 1987; Tokarska-Schlattner et al. 1997). Die **Schädigung der Membran** wird auch für andere „Stressoren“ als Primärereignis beschrieben (Schwermetalle  $\rightarrow$  DeVos et al. 1989; Kältestress  $\rightarrow$  Thompson 1994; Hitzestress  $\rightarrow$  Arora et al. 1998). Angriffspunkte sind Moleküle, die Thiolgruppen oder C-C-Doppelbindungen enthalten (Kanofsky, Sima 1995; Kronfuss et al. 1996). Schädigungen der Membranen führen zu Permeabilitätsänderungen und gesteigerten Respirationsraten (Sharma, Davis 1994).

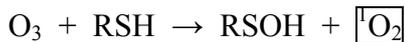
Die ungesättigten Fettsäuren der Membranlipide sind besonders anfällig für eine Ozonolyse (Mehlhorn et al. 1990). Die direkte Reaktion von Ozon mit der C-C-Doppelbindung liefert Ozonide, die zu Ketonen und „Criegee-Zwitterionen“ ( $-\text{C}^{\oplus}-\text{O}-\text{O}^{\ominus} \leftrightarrow >\text{C}=\text{O}^{\oplus}-\text{O}^{\ominus}$ ) zerfallen. Diese können an Carbonsäuren, Alkoholen und Wasser addieren, wobei Peroxide gebildet werden (Heath 1987; Hippeli, Elstner 1996). Peroxidationen führen zu Bindungen zwischen Fettsäureresten. Das wiederum hat zwangsläufig einen Funktionsverlust der Membran durch mangelnde Fluidität (nach dem *fluid-mosaic*-Modell: ständige Assoziation-Dissoziation) zur Folge, da keine Dissoziation mehr möglich ist.

Bei der **Lipidperoxidation** leiten freie Radikale ( $X^\bullet$ ) Kettenreaktionen an Fettsäuren (RH) ein. Fettsäureradikale ( $R^\bullet$ ) reagieren in der Folge mit Sauerstoff, wodurch Fettsäureperoxide ( $ROO^\bullet$ ) entstehen. Diese wiederum führen zu den verschiedensten Verknüpfungsreaktionen und Abbauprodukten (gesättigte und ungesättigte Kohlenwasserstoffe, Aldehyde, Alkohole):

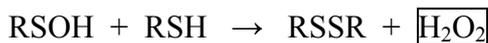


Kettenreaktion (Elstner, Osswald 1994).

Die Oxidation von **Thiolgruppen** erfolgt nach folgendem Mechanismus:



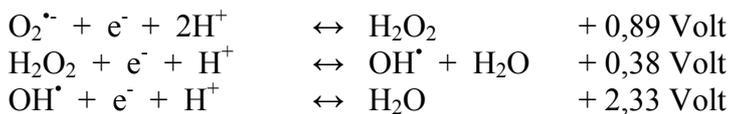
Die Weiterreaktion des intermediär gebildeten Sulfoxides mit einem weiteren Substratmolekül zu einem Disulfid (s.u.) führt zur Inhibierung spezifischer Funktionen von membranintegrierten Cystein-haltigen **Proteinen**, wie z.B. der Transportproteine, aber auch von im metabolischen Geschehen involvierten Enzymen.



(Hippeli, Elstner 1996)

Der bei dieser Reaktion entstehende Singulett-Sauerstoff kann bezüglich der Reaktivität mit dem OH-Radikal verglichen werden (Ohlenschläger 1995).

Zum Einen wird die „**Reaktivität**“ der ROS durch die Redoxpotentiale bestimmt, wobei gilt: Je stärker elektropositiv das Redoxpotential einer Verbindung ist, umso größer ist die Tendenz, einen elektronegativeren Partner zu oxidieren (und umgekehrt). Für die wichtigsten aktivierten Sauerstoffverbindungen gelten folgende Redoxpotentiale (Salin 1987; Elstner 1990):



Zum Anderen spielt die chemische Bindung für die Reaktionsfähigkeit eine Rolle. Je länger die Bindungsabstände, umso weniger Energie wird für deren Spaltung benötigt.

Das **Superoxidanion** ( $O_2^{\bullet-}$ ) reagiert kaum als typisches freies Radikal und ist im Vergleich mit den übrigen ROS weniger toxisch (Navarri-Izzo et al. 1996). Wichtig ist die Reduktion von Peroxiden durch das Superoxidanion. Bei dieser Reaktion entstehen die stärksten in der Biologie bekannten Oxidantien  $OH^\bullet$  und  $RO^\bullet$ . Ein ebenfalls starkes Oxidationsmittel ist das **Hydroperoxyradikal** ( $HO_2^\bullet$ ). Dieses entsteht unter sauren Bedingungen aus dem Superoxidanion (Salin 1987; Ohlenschläger 1995). Da in unmittelbarer Nähe von polyanionischen Oberflächen der pH-Wert niedriger ist als im Mittel des Gesamtmediums (Elstner 1990) bedeutet dies, dass in der Nähe von Membranen das Superoxidanion überwiegend als Hydroperoxyradikal vorliegt. Nach Fridovich (1986) lassen sich so verschiedene Schadberichte für das Superoxidanion erklären. Das Superoxidanion reagiert u.a. mit Phenolen, Chinonen und Hämproteinen (Katalase wird inaktiviert; Fridovich, 1986).

**Wasserstoffperoxid** ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ist das stabilste unter den reaktiven Sauerstoffspezies (Salin 1987; Ohlenschläger 1995). Es wird auch unter bestimmten Bedingungen in Geweben, Zellkulturen und Algensuspensionen angereichert. Von besonderer Bedeutung ist hier die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Akkumulation im Zusammenhang mit der *hypersensitive response*.

Seit langem bekannt ist auch die Entstehung von Wasserstoffperoxid beim photosynthetischen Elektronentransport, erstmals 1951 von H.H. Mehler beschrieben. Wasserstoffperoxid in Verbindung mit dem Superoxidanion führt über folgende als Haber-Weiss-Reaktion bekannte Reaktion zur Bildung des sehr reaktiven **Hydroxylradikals** (Salin 1987; Ohlenschläger 1995).



Aus der Metall-katalysierten Reduktion von Wasserstoffperoxid entsteht nach der sog. Fenton-Reaktion ebenfalls das Hydroxylradikal.



(Salin 1987). Hydroxylradikale reagieren mit den meisten organischen Zellkomponenten (Czapski 1984).

Der **Singulett-sauerstoff** reagiert mit den meisten organischen Verbindungen. Dabei kann der physikalische Anregungszustand des Radikals mittels *quencher* gelöscht werden, oder es kann eine chemische Reaktion stattfinden und somit Produkte über *traps* gebildet werden. Die wichtigsten natürlichen *quencher* sind  $\alpha$ -Tocopherol und  $\beta$ -Karin.

Reaktionen mit C-C-Doppelbindungen ergeben Peroxide (Frimer 1983). Aus der daraus folgenden Initiierung der Lipidperoxidation (Elstner 1990) können Membranschäden entstehen (Salin 1987, Ohlenschläger 1995).

#### f) Spezielle „Schutzwirkung“ der ROS

Erst spät wurden im pflanzlichen Bereich die positiven Aspekte der ROS-Wirkung diskutiert. Für die in tierischen/menschlichen Organismen schon länger beschriebenen **Signalwirkungen von ROS** (Goldschmidt, Moldovan 1999; Rhee 1999) finden sich auch in Pflanzen Hinweise auf deren Vorhandensein (Foyer et al. 1997; Mullineaux et al. 2000). So wird die direkte Signalfunktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Regulation der antioxidativen „Genantwort“ in Mais (Polidoros, Scandalios 1999) und die Beteiligung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  an der Induktion von mRNA für cytosolische Ascorbatperoxidase durch oxidativen Stress in Reis (Morita et al. 1999) beschrieben. Die Aktivierung von MAP-Kinase-Signalketten kann entweder durch Ozon oder alternativ durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Superoxidanionen als Aktivierungsstimuli erreicht werden (Samuel et al. 2000).

Für die Pflanze stellt diese Bi-Funktionalität der ROS einen Balanceakt dar. Der schädigenden Wirkung muss durch das Einschalten von Detoxifikationsmechanismen (zügig) entgegengewirkt werden, gleichzeitig darf die Induktion von Signalsequenzen, ausgehend von ROS, nicht zu früh gestoppt werden (Stichwort *hypersensitive response*, Apoptose; s.u.).

Regulation und Signalwirkung werden auch über den Redox-Status realisiert (Goldenberg 1998; Baginsky et al. 1999; Sen 2000; Pfannschmidt et al. 2001).  $H_2O_2$  als Signalübertragungsmolekül vermittelt Informationen über den intrazellulären Redox-Status. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Konzentrationen in jedem Kompartiment strikt zu regulieren (Noctor et al. 2000).

### g) ROS und Apoptose

Ein Stichwort, das im Zusammenhang mit einer Signalwirkung durch ROS genannt werden muss, ist die **Apoptose** (Lam et al. 1999). Dieser bei Säugetieren zuerst beschriebene „plötzliche Zelltod“ wird als eine lebenswichtige Komponente in der Entwicklung anerkannt (Kelsey 2000). Sowohl in Tieren als auch in Pflanzen spielen in der Apoptose **ROS** eine zentrale Rolle (Polla et al. 1998). Nach Wyllie (1998) „erlaubt die Apoptose den zum Untergang geweihten Zellen, sich mit kleinstmöglicher Zerstörung des umgebenden Gewebes aufzulösen“. Charakteristisch für die Apoptose ist, dass der Mechanismus, der zum Tod der Zelle führt, ein aktiver Prozess der Zelle selbst ist. Im Zusammenhang mit induzierten Abwehrmaßnahmen gegen **Pathogene** und Viren wird der Zelltod am Infektionsort als **hypersensitive Reaktion** (*hypersensitive response*) bezeichnet. Dem Pathogenangriff folgt die Aktivierung der Plasmalemma-gebundenen NAD(P)H-abhängigen Oxidoreduktase, deren Aufgabe die Produktion des Superoxid-anions ist. Bedingt durch den Anstieg der  $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration im Apoplasten kommt es - katalysiert durch die Superoxiddismutase - zur Bildung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), einem wichtigen „antimikrobiellen“ Agens und Signalmolekül. Die verstärkte Produktion von  $H_2O_2$  und der Transport des Moleküls in den Apoplasten ist unter dem Terminus **oxidative burst** bekannt (Bolwell 1996; Bolwell et al. 1999). Weitere Folgeaktionen in der Pathogenabwehr sind die Deposition von Callose, die Verstärkung der Zellwand und die Synthese sekundärer Metaboliten und Proteinen, den sog. *pathogenesis related proteins* (PR-Proteine). Neben dieser akuten Abwehr induzieren manche Pathogene auch Reaktionen in distalen Teilen der Pflanze. Diese *systemic acquired resistance* (SAR) zeigt sich bei manchen Pflanzen auch in nicht-infizierten Blättern, im Gegensatz zur *local acquired resistance* (LAR), die in infizierten Blättern in nicht angegriffenen Bereichen auftritt (Vanacker et al. 1998b; Chamnongpol et al. 1998). In Verbindung mit der Expression von PR-Proteinen während der SAR und LAR konnte neben  $H_2O_2$  auch Salicylsäure (SA) als ein Schlüsselsignal identifiziert werden. Eine Vermutung legt nahe, dass SA die  $H_2O_2$ -entgiftenden Enzyme Katalase und Ascorbatperoxidase inhibiert (Knörzer et al. 1999). Die in tierischen Organismen gefundene Verbindung der ROS-Aktionen mit dem Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) ist auch in Pflanzen realisiert (Dangl 1998; Delledonne et al. 1998).

Es gibt Ähnlichkeiten zwischen Ozon-induziertem Zelltod und Pathogen-induzierter *hypersensitive response* (Schraudner et al. 1996). Auch nach Ozoneinfluss konnte eine Akkumulation von  $H_2O_2$  beobachtet werden (Rao, Davis 1999) Weiter wird vermutet, dass auch durch Ozon ein Signalübertragungsmechanismus, u.a. über Salicylsäure, Jasmonsäure und/oder Ethen induziert wird. Für eine *Arabidopsis*-Mutante konnte eine Abhängigkeit von der Salicylsäure-Konzentration und der Ozontoleranz gezeigt werden (Rao, Davis 1999). Zudem kann Ozon als ROS-Aktivator die Akkumulation von

Salicylsäure in Blättern induzieren (Enyedi 1999). Ozon-induzierter Zelltod kann somit als typische HR interpretiert werden (Rao, Davis 1999), jedoch kann Ozon als starkes Oxidationsmittel auch Zellschäden und -zerstörungen verursachen, die primär keine planmäßigen Abläufe erkennen lassen.

## h) Toleranz und Sensitivität

Große Unterschiede können auch hinsichtlich der **Sensitivität** verschiedener Pflanzen gegenüber Ozon beschrieben werden. Nicht nur für die Wissenschaft ist das Vorkommen sowohl ozontoleranter als auch -sensitiver Pflanzen von Bedeutung. Die Bemühungen gehen dahin, noch tolerantere bzw. hypersensitive Spezies zu selektieren. Erstere werden aus (land)wirtschaftlicher Sicht benötigt, die sensitiven Pflanzen dienen vielfach als Grundlage zur Erforschung der Ozonsensitivität. Bekannteste *monitoring* Pflanze (Feder 1978) für Ozonuntersuchungen ist der Tabak. Dabei wird die Varietät *Bel W<sub>3</sub>* als sensitiv und *Bel B* als tolerant eingestuft (Heggstad 1991; Städtler, Ziegler 1993).

Zahlreiche Kulturpflanzen werden als ozonsensitiv eingestuft. Hier sind zu nennen: Gerste, Weizen, Roggen, Hafer, Zuckermais, Kartoffel, Tomate, Spinat, Tabak, Klee, Wein und Zwiebel. Als toleranter werden Senf, Zuckerrübe und Erdbeeren beschrieben. Viele Laubbäume gelten als relativ ozonsensitiv, besonders tolerant ist hingegen die Fichte (Brunold et al. 1996). Aus anderer Quelle (Larcher 1994) ergibt sich die folgende Einteilung: Als sehr empfindlich gelten Getreide, Futtergräser, Spinat, Solanaceen, Eiche, Pappel, Esche; als mäßig empfindlich: Brassicaceen, Fabaceen, Rhododendron, Tanne, Lärche; und als wenig empfindlich: Reis, Asteraceen, Ahorn, Birke, Buche, Wacholder, Fichte. Wie der Vergleich der beiden Aufzählungen zeigt, wäre es zum besseren Verständnis sinnvoll, die der Einteilung zugrunde gelegten Kriterien zu nennen. Auch von Verallgemeinerungen sollte abgesehen werden, da es von vielen Pflanzenarten zwischenzeitlich unterschiedliche Varietäten bezüglich der Sensitivität/Toleranz gibt. Am Beispiel von *Arabidopsis* konnte eine Abhängigkeit von Langlebigkeit und Toleranz gezeigt werden (Kurepa et al. 1998).

## i) Abwehrmechanismen

Pflanzen(zellen) haben **antioxidative Abwehrmechanismen** entwickelt, mit deren Hilfe die Gefahr durch ROS gebannt werden kann. Die an dieser Stelle immer wieder zu findende klassische Unterteilung in enzymatische und nicht-enzymatische, d.h., durch kleine Moleküle getragene Entgiftungsprozesse kann nicht als absolute Trennung verstanden werden. Vielmehr sollte der Netzwerkstruktur, d.h., den komplexen Reaktionsabläufe mit den gegenseitigen Abhängigkeiten bzw. Beeinflussungen Rechnung getragen werden. Als **kleinmolekulare Verbindungen** tragen Ascorbat, Glutathion,  $\alpha$ -Tocopherol, Mannitol, Phenole, Karotinoide, Polyamine und Flavonoide zur Entgiftung bei (Meister, Anderson 1983; Robak, Gryglewski 1988; Alscher 1989; Polle et al. 1995; Conklin et al. 1996; Rice-Evans et al. 1996+1997; Foyer et al. 1997; Shen et al. 1997; Hagermann et al. 1998; Balavoine, Geletii 1999; Packer et al. 2001; Loretto et al. 2001). Unter den **Enzymen** sind Peroxidasen (Ascorbatperoxidase, Glutathionperoxidase, unspezifische Peroxidasen), Reduktasen (Glutathionreduktase, Dehydroascorbatreduktase, Glutaredoxin), Transferasen (Glutathion-S-Transferase), sowie die Katalase

und Superoxiddismutase zu nennen (Asada 1992; SenGupta et al. 1993; Edwards et al. 1994; Conklin, Last 1995; Creissen et al. 1996; Yamasaki et al. 1997; Ushimaru et al. 1997, Luikenhuis et al. 1998; Fisher et al. 2000).

Die bekannteste metabolische Reaktionsfolge ist hierbei das zuerst in Chloroplasten entdeckte **Ascorbat-Glutathion-System** auch *Halliwell-Asada-System* genannt (Abb. 2; Foyer, Halliwell 1976). Eine zentrale Rolle spielt hierbei die reduzierte Form des Ascorbats. Zum einen kann es spontan mit Superoxidradikalen reagieren, hierbei entstehen  $H_2O_2$  und Dehydroascorbat. Zum anderen kann es, katalysiert durch das Enzym Ascorbatperoxidase  $H_2O_2$  entgiften. Bei dieser Reaktion entstehen Dehydroascorbat und Wasser. Zur Regeneration wird Dehydroascorbat mit Hilfe der Glutathion-abhängigen Dehydroascorbatreduktase reduziert. Das oxidierte Glutathion (GSSG) wird auf Kosten von  $NADPH + H^+$  durch die Glutathionreduktase wieder in die reduzierte Form überführt (Law et al. 1983). Diese Kaskade sichert die schnelle Regeneration von Ascorbat, damit dieses dem Entgiftungsgeschehen kontinuierlich zur Verfügung steht. Die Anwesenheit von Ascorbat in ausreichenden Konzentrationen ist auch notwendig, um eine Inaktivierung der chloroplastischen Isoform der Ascorbatperoxidase zu verhindern (Nakano, Asada 1987).

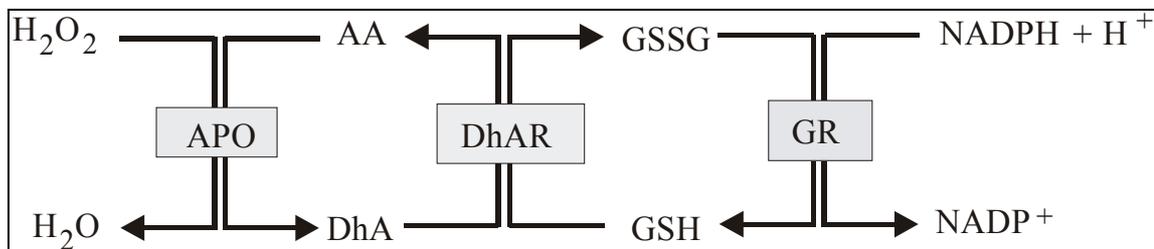


Abb. 2: Ascorbat-Glutathion-System (Reaktionsfolge zur  $H_2O_2$ -Entgiftung)

APO = Ascorbatperoxidase; AA = reduziertes Ascorbat; DhA = oxidiertes Ascorbat (Dehydroascorbat); DhAR = Dehydroascorbatreduktase; GSSG = oxidiertes Glutathion; GSH = reduziertes Glutathion; GR = Glutathionreduktase;  $NADPH+H^+$  = Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form); NADP = Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)

Fettsäureradikale und Singulett-Sauerstoff können in Thylakoidmembranen durch  $\alpha$ -Tocopherol und  $\beta$ -Karatinnmolekülen entgiftet werden. Oxidiertes  $\alpha$ -Tocopherol kann unmittelbar von Ascorbat reduziert werden (Jakob, Heber 1998). Ascorbat kann auch direkt Hydroxylradikale entgiften, hierbei entstehen Dehydroascorbat und Wasser (Rose 1990). In welchem Ausmaß und über welche Wege die einzelnen Detoxifikationsreaktionen und Reaktionsfolgen unter Ozoneinwirkung ablaufen, ist abhängig von der untersuchten Pflanzenart bzw. -varietät.

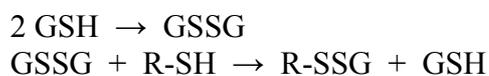
**Ascorbat** ist der am häufigsten untersuchte Ozon/ROS-scavenger, nicht nur innerhalb der beschriebenen metabolischen Sequenz (Smirnoff, Wheeler 2000). Neben der „dominanten Rolle im Entgiftungsprozess der *reactive oxygen species*“ (Moldau 1998) kommen Aufgaben bei der Photosynthese, wie der Schutz des Photosyntheseapparates gegen Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid sowie gegen Photoinaktivierung, hinzu (Forti, Elli 1995; Smirnoff 2000a+b). Darüber hinaus ist Ascorbat ein wichtiger Co-Faktor für die Synthese des „Energiequencher“ Zeaxanthin und ist auch für die

Zellproliferation und Lignin-Biosynthese von Bedeutung (Pallanca, Smirnov 1999; Foyer, Lelandais 1996; Veljovic-Jovanovic et al. 2001). Bei oxidativem Stress kann der Zellzyklus in der G2/M-Phase arretiert werden, wenn Ascorbat vermehrt in der oxidativen Form (Dehydroascorbat) vorliegt (Bijur et al. 1999). Dieses Arretieren gibt der Zelle Zeit, Schäden zu reparieren, bevor der Übergang in die nächste Phase des Zellzyklus erfolgt (Shackelford et al. 1999). Das Ascorbat/Dehydroascorbat-Verhältnis gilt als Indikator für den Grad der Stresseinwirkung einer Pflanze (Kampfenkel et al. 1995). Die Funktionen von Ascorbat bei der über den Redox-Status der Zelle vermittelten Signaltransduktion wird diskutiert (Grosch, Wieser 1999).

So weit gefächert wie die einzelnen Funktionen, so umfangreich sind die in der Literatur vorliegenden Ergebnisse über Veränderungen von Ascorbatkonzentrationen unter „Stressbedingungen“ und auch speziell nach Ozonbehandlung. Erhöhte Ascorbatkonzentrationen nach Ozoneinwirkung sind ebenso zu verzeichnen wie unveränderte Ascorbat-*Poolgrößen* (Lyons et al. 1999). Aus unterschiedlichen Literaturangaben wird deutlich, dass eine positive Korrelation zwischen Ascorbat-Gehalt und Ozonresistenz bestehen kann. Vergleiche von unterschiedlich sensitiven Klonen einer Pflanzenart zeigen, dass verschiedene Ascorbatkonzentrationen auftreten, wobei die höheren Konzentrationen in den toleranteren Klonen zu finden waren (Yun, Laurence 1999).

Immer mehr an Bedeutung gewinnt auch die Frage der Lokalisation von Ascorbat in der Zelle. In den Mesophyllzellen liegen 20-40 % des Ascorbats in Chloroplasten vor. Das restliche Ascorbat ist auf das Cytosol, die Vakuole und den Apoplasten verteilt (Doullis et al. 1997).

Das zur Reduktion von oxidiertem Ascorbat mittels der Dehydroascorbatreduktase benötigte Cosubstrat ist das **Glutathion**. Auch diesem Molekül werden eine Reihe weiterer Funktionen im Zellmetabolismus zugeschrieben. So spielt es eine Rolle bei der Synthese von Proteinen und DNA, als Speicher- und Transportform für Cystein (Meister, Anderson 1983) und Schwefel (Alscher 1989), in der Phytochelatinsynthese (Noctor et al. 1997) und in der Detoxifikation von Xenobiotica (Lamoureux, Rusness 1993). Von Bedeutung ist auch die Tatsache, dass Glutathion Enzyme und andere zelluläre Komponenten in reduzierter Form bewahrt, d.h., den zellulären Redox-Status stabilisiert. Über Thioldisulfid-Austausch kann es den Thiolstatus und somit die Funktionsfähigkeit von Proteinen aufrecht erhalten (Navari-Izzo et al. 1997). Die dabei beobachtete Verminderung des freien GSH-Pools erklärt sich über folgenden Reaktionsmechanismus (Taulavuori et al. 1999):



Die „Kardinalrolle im Schutz gegen oxidativen Stress“ (Noctor et al. 1997) zeigt sich auch in den direkten Reaktionen mit freien Radikalen wie Hydroxylradikalen und Superoxidanionen (Sharma, Davis 1994).

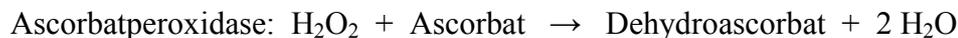
Die Funktionsweise von Glutathion setzt voraus, dass oxidiertes Glutathion (GSSG) sehr schnell wieder reduziert und somit dem System wieder zur Verfügung gestellt wird. Eine hohe GSH/GSSG-Rate ist nicht nur in der Funktion als Reduktionsmittel von Bedeutung, sondern auch zur Erlangung einer optimalen Proteinsynthese (Alscher 1989; Navari-Izzo et al. 1997; Foyer, et al. 1997).

Die antioxidative Rolle wurde sowohl in heterotrophem als auch in phototrophem Gewebe für unterschiedliche „Stressoren“ belegt (Alscher 1989). Das Vorkommen von Glutathion wird im Chloroplasten, Mitochondrien und im Cytosol beschrieben; die Angaben für den Apoplasten sind nicht einheitlich (Vanacker et al. 1998a+b; Luwe, Heber 1995; Luwe 1996). Auf die bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Redox-Status wurde schon hingewiesen. 95-98 % des Gesamtglutathions in den Chloroplasten und ca. 90 % in der Zelle als Ganzes liegt in reduzierter Form vor (Luwe, Heber 1995). Dem „Redox-Puffer“ Glutathion wird auch eine nicht unerhebliche Rolle bei der Signalwirkung und der zellulären Homöostase zugeschrieben. Demnach kann auch Glutathion (neben Ascorbat, s.o.) den intrazellulären Redox-Status vermitteln: Störungen im Glutathion-Reduktions-Status führen zu Änderungen in der Genexpression (Wingsle, Karpinski 1996; Foyer et al. 2001; Kocsya et al. 2001) Sowohl die Angaben zur Verschiebung des GSH/GSSG-Verhältnisses als auch die der Veränderung in der Gesamtglutathionkonzentration unter Stresseinwirkung sind nicht einheitlich (Luwe, Heber 1995; Maldonado, Pahlich 1997; Noctor et al. 1998, Rao, Davis, 1999).

Die Reaktionen von Ascorbat und Glutathion werden vielfach durch die entsprechenden Enzyme unterstützt. Das Entgiften des relativ stabilen Wasserstoffperoxides erfolgt über **Peroxidasen** und **Katalase**. Diese Häm-Proteine katalysieren die Detoxifikation über folgende Reaktionen (Salin 1987):



Spezifische Peroxidasen:



**Katalase** kommt in allen Pflanzen und Tieren und in den meisten aeroben Mikroorganismen vor. Hauptwirkorte sind die Peroxisomen und Glyoxysomen. Auch in anderen Kompartimenten kann Katalase nachgewiesen werden; eine Ausnahme hierbei sind die Chloroplasten. Die Entgiftung des Wasserstoffperoxides wird hier ausschließlich von Peroxidasen übernommen (Smirnoff, Pallanca 1996).

Pflanzen haben eine große Anzahl von **Peroxidasen** mit unterschiedlichen Substratspezifitäten. Assoziiert mit der Zellwand üben sie Funktionen bei der Lignifizierung durch Polymerisation von phenolischen Komponenten aus (Takahama, Oniki 1997). Über den Abbau von Indolelessigsäure spielen sie eine wichtige Rolle während des Wachstums (Zellwandauf- und -abbau, Kontrolle der Zellwandplastizität) und der Entwicklung. Auch in der Biosynthese von Ethen sind Peroxidasen involviert (Asada 1992). Peroxidasen spielen eine Rolle bei der Wundheilung, der Salzstresskontrolle, der Pathogenabwehr über die *hypersensitive response* und der Protoplastenregeneration (DeMarco et al. 1999).

In der Vakuole lokalisierte Peroxidasen können mit Flavonoiden als Elektronendonator Wasserstoffperoxid entgiften (Yamasaki et al. 1997).

Durch die katalytische Wirkung von **Glutathionperoxidasen** können Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid entgiftet werden. Diese Reaktion spielt eine Schlüsselrolle in der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Entgiftung von tierischen Mitochondrien; eine Analogie in Pflanzen ist noch

fraglich (Nakano, Asada 1981; Salin 1987). Es gibt bislang nur wenige Hinweise auf das Vorkommen pflanzlicher Glutathionperoxidasen (Eshdat et al. 1997).

Die Thylakoid-gebundene **Ascorbatperoxidase** fungiert als *scavenger* für das am Photosystem I gebildete Wasserstoffperoxid. Über das Ascorbat-Glutathion-System im Stroma können weitere Entgiftungen erfolgen (Smirnoff, Pallanca 1995; Nakano, Asada 1981).

Ein Isoenzym der Ascorbatperoxidase ist in der Membran von Microbodies lokalisiert. Die hohe Ascorbatspezifität, verbunden mit dem Fehlen von Ascorbat in Microbodies und der Membrandurchlässigkeit von Wasserstoffperoxid lässt vermuten, dass das Enzym H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> außerhalb der Microbodies entgiftet (Yamaguchi et al. 1995). Weitere Ascorbatperoxidase-Isoenzyme sind im Cytosol (Asada 1992; Ushimaru et al. 1997) und im Apoplasten (Ranieri et al. 1996) lokalisiert. In letzterem ist die Reduktion von Wasserstoffperoxid bei der „Stressantwort“ von besonderer Bedeutung für die Pflanzen (Castillo, Greppin 1988; Vanacker et al. 1998a). Unter Ozonwirkung kann ein Anstieg der Ascorbatperoxidase-Aktivität verzeichnet werden (Ranieri et al. 1996).

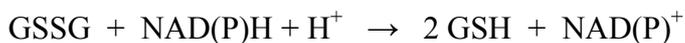
Zur Gruppe der Metalloenzyme gehört die **Superoxiddismutase**. Sie katalysiert die Disproportionierung von Superoxidanionen nach folgender Reaktion (Fridovich 1986):



Es existieren 3 Typen der Superoxiddismutase (SOD), die sich aufgrund ihrer metallischen Cofaktoren unterscheiden. Kupfer/Zink-SOD kommt in allen Eukaryoten vor und ist in höheren Pflanzen in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert (Cytosol, Chloroplast, Mitochondrium). Mangan-SOD kommt sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vor und ist in höheren Pflanzen hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert. Für einige Pflanzen konnte das Vorkommen in Glyoxysomen und Peroxisomen gezeigt werden. Eisen-SOD zeigt vielfach Ähnlichkeiten mit Mangan-SOD und kann sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten nachgewiesen werden. Eisen-SOD liegt bei einigen Pflanzenspezies in den Chloroplasten vor, konnte aber in Tieren nicht nachgewiesen werden (Salin 1987; Scandalios 1993; Bowler et al. 1994). Die Analyse transgener Pflanzen zeigte, dass eine Überexpression von Superoxiddismutase die Pflanzen vor oxidativem Stress schützen konnte (SenGupta et al. 1993).

In Verbindung mit dem sehr effektiven Schutzsystem - dem Ascorbat-Glutathion-System - sind zwei weitere Enzyme, die Ascorbat und Glutathion reduziert halten, von Bedeutung: Glutathionreduktase und Dehydroascorbatreduktase.

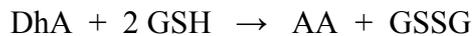
**Glutathionreduktase** katalysiert die folgende Reaktion (Salin 1987):



Glutathionreduktase ist sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vertreten. In höheren Pflanzen ist der Hauptteil der Glutathionreduktase-Aktivität im Chloroplasten lokalisiert. Aber auch im Cytosol und in Mitochondrien kann Glutathionreduktase-Aktivität nachgewiesen werden (Edwards et al. 1990).

Durch Stresseinwirkung kann die Glutathionreduktase-Aktivität erhöht werden, sie kann aber auch unverändert bleiben (Edwards et al. 1994; Creissen et al. 1995).

Für die **Dehydroascorbatreduktase** dient reduziertes Glutathion als Elektronendonator. Dehydroascorbatreduktase katalysiert die 2-Elektronen-Reduktion von Dehydroascorbat (DhA) zu Ascorbat (AA) nach folgender Reaktion (Salin 1987):



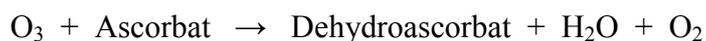
Das Enzym ist von besonderer Interesse weil die Dehydroascorbatreduktase die beiden „Teilsysteme“ Ascorbat und Glutathion miteinander verbindet. Dehydroascorbatreduktase-Aktivität ist im Chloroplasten, im Cytosol, in Mitochondrien und in Peroxisomen zu verzeichnen (DeTullio et al. 1998).

*In vitro* kann auch für andere Enzyme wie Glutaredoxin, Proteindisulfid-Isomerase und Thioredoxin eine der Dehydroascorbatreduktase-Aktivität entsprechenden Funktion nachgewiesen werden (DeTullio et al. 1998). Die Funktion von Glutaredoxin und Thioredoxin kann in folgenden zellulären Prozessen beschrieben werden: Reduktion von Dehydroascorbat, Proteinfaltung und –regulation, Schwefelmetabolismus. In Hefe konnte *in vivo* die Rolle von Glutaredoxin als „Schutzenzym“ gegen ROS nachgewiesen werden (Luikenhuis et al. 1998).

#### j) **Ozonwirkung im Apoplasten**

Das Vorliegen von **extrazellulärem Ascorbat** ist nicht nur bei Untersuchungen der Ozondetoxifikationen von großem Interesse. Die wässrige Phase des Apoplasten ist der Ort, an dem Ozon und die ROS entgiftet werden müssen, wenn der Zerstörung von Membranen und cytosolischen Komponenten vorgebeugt werden soll. Ozondetoxifikation im Apoplasten durch Ascorbat wurde für verschiedene Pflanzen beschrieben (Luwe et al. 1993; Luwe, Heber 1995; Ranieri et al. 1996; Ranieri et al. 1999; Plöchl 2000; Turcsanyi et al. 2000; van Hove et al. 2001). Für andere „Stressoren“ wie z.B. Pathogeninfektionen ist die Ascorbatwirkung im Apoplasten ebenfalls belegt (Vanacker et al. 1998b).

Die Reaktion von Ascorbat mit Ozon und den ROS führt zur Oxidation des Ascorbatmoleküls:



Diese Reaktion läuft nach einer 1:1-Stöchiometrie ab. Die Effektivität von Ascorbat bei der Ozondetoxifikation im Apoplasten wird kontrovers beurteilt. Zum einen wird die Vermutung aufgestellt, dass – ausgehend von Modellberechnungen – Ascorbat den Hauptanteil des eindringenden Ozons direkt entgiften kann (Moldau 1998), bzw. – im realistischen Versuchsablauf – die Entgiftung von mindestens der Hälfte des Ozons übernimmt (Moldau et al. 1997; Moldau 1999). Zum anderen gibt es den Hinweis, dass Ascorbat nicht so effektiv wie erwartet arbeitet und somit nur 5-10 % des Ozon entgiftet (Jakob, Heber 1998). Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass auch das Vorliegen von erhöhten Ascorbatkonzentrationen im Apoplasten die Pflanze vor Schädigungen nicht zu schützen vermag.

Ungefähr 80-90 % des im Apoplasten vorliegenden Ascorbats liegt in der reduzierten Form vor. Im Gegensatz dazu können nach Ozonbehandlung bis zu 90 % des Ascorbats in oxidiert Form nachgewiesen werden (Luwe, Heber 1995).

Unter der bislang bestehenden Annahme, dass Ascorbat im Cytosol synthetisiert wird (Foyer, Lelandais 1996), muss es durch die zellulären Membranen in die Reaktionskompartimente transportiert werden (können). Noch wird die Frage nach der Existenz von **Ascorbattranslokatoren** kontrovers diskutiert. Ihr Vorkommen erscheint jedoch sehr wahrscheinlich. Bereits in den 80er Jahren wurde für Chloroplasten ein Ascorbattranslokator identifiziert (Anderson et al. 1983). Auch für das Plasmalemma wurde das Vorkommen eines Ascorbat-Carriers beschrieben (Luwe, Heber 1995; Horemans et al. 1997+1998+2000). Der Transport von Ascorbat vom Cytosol in den Apoplasten kann auch über passive Diffusion (Konzentrationsgradient) erfolgen (Bichele et al. 2000), während der Transport von Ascorbat und (vor allem) Dehydroascorbat zurück ins Cytosol Carrier-vermittelt ablaufen soll (angetrieben über einen durch Protonen aufgebauten elektrochemischen Gradienten; Takahama 1998). Zudem wird die Möglichkeit des Dehydroascorbat-Transportes über Glucose-Transporter diskutiert (Prasad et al. 1999). Da es bislang keinen Beweis für die Reduktion von Dehydroascorbat im Apoplasten gibt, wird vermutet, dass (hauptsächlich) Dehydroascorbat ins Cytosol transportiert und dort reduziert wird (Luwe, Heber 1995; Horemans et al. 1997+1998; Jakob, Heber 1998), eine Beobachtung, die in einer Arbeit an Birken bestätigt wurde (Kollist et al. 2001).

Das Vorkommen von **Glutathion** im Apoplasten wurde gezeigt (Moldau 1998; Vanacker et al. 1998b), aber auch anhand weniger Beispiele widerlegt (Jakob, Heber 1998). Im Vergleich zu Ascorbat wird die Reaktion von Glutathion mit Ozon als 10-20 fach langsamer beschrieben (Jakob, Heber 1998; Ranieri et al. 1996). Ein Translokator für Glutathion ist im Plasmalemma der Pflanzen zur Zeit noch nicht lokalisiert. Humanmedizinische Arbeiten beschreiben für den Glutathion-Transport ein *multidrug resistance protein* (MRP1/2) und einen damit verbundenen ATP-abhängigen Transport des Moleküls. Für Hefen konnte analog ein sogenannter YCF1-Transporter identifiziert werden (Rebber et al. 1998).

Über das Vorkommen der **Glutathionreduktase** im Apoplasten wird vereinzelt berichtet (Vanacker et al. 1998a+b). Die Detoxifizierungsfähigkeit von Sauerstoffradikalen durch das Enzym gilt als erwiesen. Eine Korrelation zwischen Glutathionreduktase-Aktivität und einer möglichen Ozontoleranz wird kontrovers diskutiert (Kangasjärvi et al. 1994, Edwards et al. 1994).

Das Vorkommen von **Dehydroascorbatreduktase**-Aktivität wird unterschiedlich gesehen: In einigen Untersuchungen konnte sie im Apoplasten nachgewiesen werden (Vanacker et al. 1998a+b; Hernández et al. 2001a), andere verneinten das Vorkommen dieses Enzyms in diesem Kompartiment (Castillo, Greppin 1988; Luwe et al. 1993; Luwe 1996).

Relativ übereinstimmend ist dagegen die Meinung bezüglich der **Peroxidasen**. Sowohl die unspezifische Peroxidase-Aktivität als auch die spezielle Ascorbatperoxidase-Aktivität wird für den Apoplasten beschrieben (Vanacker et al. 1998a+b). Peroxidasen können unter Oxidation kleinmolekularer Phenole  $H_2O_2$  reduzieren und sind somit in den Lignifizierungsprozess involviert (Takahama et al. 1996). So wurde ein Anstieg der Peroxidase-Aktivität nach Ozoneinwirkung gezeigt (Kronfuss et al. 1996). Dieser Anstieg konnte auch im Fall der extrazellulären Ascorbatperoxidase-Aktivität beobachtet werden (Ranieri et al. 1996).

Auch das Vorkommen der **Superoxiddismutase** im Apoplasten wurde gezeigt (Vanacker et al. 1998a+b). Ein deutlicher Anstieg der Superoxiddismutase-Aktivität nach Ozoneinwirkung konnte gezeigt werden (Kangasjärvi et al. 1994).

Das Vorkommen einzelner Bestandteile des Ascorbat-Glutathion-Systems im Apoplasten kann nicht mit Sicherheit die Frage nach der Regenerationsmöglichkeit von Ascorbat und Glutathion in diesem Kompartiment beantworten. Ein vollständiges Reduktionspotential setzt neben dem Vorhandensein aller beteiligten Komponenten des Zyklus auch die Versorgung des Systems mit Reduktionsäquivalenten voraus. Diesbezüglich ist bislang noch nicht zu verzeichnen, dass es einen Hinweis für das Vorhandensein einer *reducing power* in Form von NADPH+H<sup>+</sup> im Apoplasten gibt (Horemans et al. 2000).

Wie aus diesen Ausführungen ersichtlich, zeichnen sich die auf pflanzliche und tierische Organismen „bedrohend“ wirkenden Umwelteinflüsse durch eine Vielfalt an Erscheinungsformen aus. Studien über Reaktionen von Pflanzen auf „Stressoren“ geben einen Einblick in den weitgefächerten Aufbau des pflanzlichen Metabolismus: seine Flexibilität, Plastizität, Diversität, Stabilität. Aber auch – oder vor allem – seine Grenzen.

## Zielsetzung

Auf phänotypischer Ebene kann bei den für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stehenden *Phaseolus vulgaris* Varietäten zwischen ozontoleranten (‘Tenderette’) und ozonsensitiven (‘Oregon’) Pflanzen unterschieden werden. Nun soll sich zeigen, in wie weit eine solche Unterscheidung auch auf **physiologischer Ebene** erfasst werden kann. Darüber hinaus soll ermittelt werden, ob das von uns ausgewählte **Subsystem (Ascorbat-Glutathion-System, auch Halliwell-Asada-System)** bei Ozoneinwirkung eine zentrale Rolle in den Abwehrreaktionen bei *Phaseolus* spielt und ob es Grundlage für eine weiterreichende Diskussionen sein kann. Hierzu muss zunächst eine **umfassende Charakterisierung** des Systems bei unterschiedlichen Entwicklungszuständen und unter verschiedenen Milieubedingungen erfolgen. Als externer Stressfaktor wird Ozon appliziert.

Des Weiteren soll eine vergleichende Analyse des Systems in den einzelnen **Kompartimenten** zeigen:

- a) welches Kompartiment ist der **primäre Wirkort** des Ozons und
- b) wie stellen sich die **Auswirkungen** des Ozons auf Nachbarkompartimente dar.

Hierzu sollen die Komponenten des Systems in den einzelnen Kompartimenten analysiert werden. Darauf aufbauend soll eine umfassende Charakterisierung desjenigen Kompartiments stattfinden, in dem die primäre Ozonwirkung lokalisiert wird. Unter der Annahme, dass die Verhältnisse in *Phaseolus* konform mit den in der Literatur zu findenden Analysen anderer Pflanzen gehen bedeutet dies, dass der **Apoplast** ins Zentrum der Untersuchungen rücken wird. Hier sollen sowohl pflanzlichen **Abwehrreaktionen** (vermittelt über das Ascorbat-Glutathion-System) erfasst werden, als auch der Frage nach einer Sekundärwirkung von Ozon über **Radikale** nachgegangen werden. Das daraus resultierende Bild von *actio* (Ozon- bzw. Radikalwirkung) und *reactio* (hier: Ascorbat-Glutathion-System) – nicht nur im Apoplasten – soll Grundlage für einen auf physiologischer Ebene anzusiedelnden „**Erklärungsansatz**“ für die phänotypisch erkennbaren **Toleranzunterschiede** unter Ozoneinwirkung sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Zentrifugen: Hermle Z 320 K  
Polytron PT 3000  
Spektralphotometer: Gilford 240  
Photometer: Eppendorf Filterphotometer 1101 M  
Waagen: Mettler PM 300; Mettler Analysenwaage H 54  
Heraeus Trockenschänke  
Knick pH-Meter mit Schott Elektroden

### 2.2 Chemikalien und chem. Abkürzungen

Alle verwendeten Chemikalien haben p.a. Qualität und wurden von folgenden Firmen bezogen:

**Merck** (Puffersubstanzen, Metaboliten, Säuren, Bestandteile der Nährlösungen)  
**Sigma/Aldrich** (Puffersubstanzen, Metaboliten, Glutathionreduktase aus Hefe, Phenolrot, PVP, Bestandteile der Nährlösungen, NEM, Bipyridyl, Zucker)  
**Serva** (Puffersubstanzen, Coomassie Brilliant Blue, Reduktionsäquivalente, BSA, PMS, MTT, Bestandteile für die Fixierungen zur REM-Untersuchung, Verdauungsenzyme zur Protoplastenisolierung, Bestandteile der Nährlösungen, DTT)  
**Roth** (Rotiphorese Gel 30, Alkohole, Aceton)

Bei dem genannten Wasser handelt es sich - sofern keine anderen Angaben gemacht wurden - um Aqua bidest.

Bicine  $\Rightarrow$  (N,N-bis[2-Hydroxyethyl]glycine)  
BSA  $\Rightarrow$  Bovine Serum Albumine Fraktion V (*elektrophoresis*)  
DPPH  $\Rightarrow$  (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl Radikal)  
DTT  $\Rightarrow$  DL-Dithiothreitol  
DTNB  $\Rightarrow$  5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic Acid)  
EDTA  $\Rightarrow$  Ethylenediaminetetraacetic Acid  
GSH/GSSG  $\Rightarrow$  Glutathion (reduzierte Form)/Glutathion (oxidierte Form)  
Hepes  $\Rightarrow$  (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])  
MES  $\Rightarrow$  (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid)  
MTT  $\Rightarrow$  (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)  
NEM  $\Rightarrow$  N-Ethylmaleimide  
NBT  $\Rightarrow$  Nitro Blue Tetrazolium  
PMS  $\Rightarrow$  Phenazine Methosulfate  
PVP  $\Rightarrow$  Polyvinylpyrrolidone

TCA ⇒ Trichloracetic Acid  
TEA ⇒ Triethanolamine  
TNB ⇒ Tetranitro Blue Tetrazolium  
Tris ⇒ Tris(hydroxymethyl)aminomethane]  
Tween ⇒ Polyoxyethylenesorbitan

## 2.3 Pflanzenmaterial

Für die Untersuchungen wurden 2 Varietäten von *Phaseolus vulgaris* verwendet. Aufgrund des phänotypischen Erscheinungsbildes nach Ozoneinwirkung wird *Phaseolus vulgaris* var. 'Tenderette' als ozontolerant und *Phaseolus vulgaris* var. 'Oregon' als ozonsensitiv eingestuft.

Kultiviert wurden die Pflanzen in einem Erde-Kompost-Gemisch (3:1) in Töpfen mit 12 cm Durchmesser (*Fruhstorfer*-Einheitserde; Kompost aus Eigenkompostierung des Instituts). Die Samen wurden 24 h auf Filterpapier im Dunkeln vorgequollen. Die Aussaat erfolgte auf Anzuchterde (*Fruhstorfer*) in Schalen (45x30x5 cm). Die Pflanzen wurden direkt ins Freiland überführt und im Alter von ca. 1 Woche pikiert (eine Pflanze pro Topf). Gegossen wurde je nach Bedarf (ggf. täglich). Es wurde wöchentlich mit einer nach Knoop modifizierten Düngerlösung gedüngt. Pro Liter Wasser werden folgende Substanzen gelöst: 145 mg K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8.5 mg CaSO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O, 185 mg MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O, 105 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.1 mg Na<sub>2</sub>EDTA \* 2 H<sub>2</sub>O, 180 mg NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.005 mg FeCl<sub>3</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O, 1 mg MnCl<sub>2</sub> \* 4 H<sub>2</sub>O, 0.146 mg CuSO<sub>4</sub> \* 5 H<sub>2</sub>O 0.318 mg ZnSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O, 1 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.03 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O.

Je Versuchsansatz wurden ca. 50 Pflanzen pro Varietät benötigt. Die Ernte erfolgte in 4 bzw. 7 Tagen Abstand, jeweils vormittags. Alle Blätter waren bei der Ernte vollständig entfaltet. Um vergleichbare Analysen durchführen zu können, wurden immer das 1. und 2. Folgeblatt einer Pflanze geerntet. (Ausschluss von Schwankungen aufgrund von Alterungserscheinungen sowie diurnale Schwankungen.) Voruntersuchungen ergaben, dass sich diese beiden Blättagen physiologisch entsprechen. Es wurden jeweils die Blätter von 3 Pflanzen als Untersuchungsmaterial verwendet.

## 2.4 Ozonbehandlung

Die Ozonbehandlung erfolgte in Freilandversuchsanlagen des Institutes für Pflanzenökologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Zur Ozonapplikation standen *open-top*-Kammern (Beschreibungen zur Anlage siehe Fangmeier et al. 1992) zur Verfügung. Für die erste Serie der Gesamtblattanalysen sowie für die Radikaldetektionen und die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Pflanzen verwendet, die mit 50 ppb Ozon, addiert zur Außenluft, behandelt wurden. Die Kontrollpflanzen wurden ausschließlich unter Außenluftbedingungen kultiviert. Die vergleichenden Gesamtblatt- und Apoplastenuntersuchungen wurden an Pflanzen vorgenommen, die mit 30 ppb Ozon, addiert zur Außenluft, behandelt wurden. Die Ozonbehandlung fand durchgehend (d.h. 24 Stunden pro Tag) statt. Die Ozongeneration erfolgte mit einem Ozongenerator aus reinem Sauerstoff. Das entstandene Ozon wurde mit Außenluft gemischt und in die Kammern geleitet. Die Ozon-

Konzentrationen in den Kammern wurden in regelmäßigen Abständen (8 Minuten) analysiert. Die Experimente wurden je 3 mal wiederholt (Juni, Juli, August) und über den Zeitraum von 3 Jahren durchgeführt.

## 2.5 Biochemische Gesamtblattanalysen

### 2.5.1 Extraktgewinnung

#### 2.5.1.1 Metaboliten

Zur Bestimmung von Ascorbat und Glutathion wurde tiefgefrorenes Pflanzenmaterial verwendet. Zur **Ascorbat**-Bestimmung (nach Okamura 1980) wurde Pflanzenmaterial in einem Verhältnis von 1:10 mit 0.1 N HCl + 10 % (w/w) PVP bei 4 °C im Porzellanmörser homogenisiert.

Ebenfalls im Verhältnis 1:10 wurde zur **Glutathion**-Bestimmung (nach O’Kane et al. 1996) in 8 %iger (w/v) Sulfosalicylsäure + 10 % (w/w) PVP bei 4 °C extrahiert. Nach Filtration und Zentrifugation konnte aus geklärtem Überstand Ascorbat direkt und Glutathion nach Neutralisation mit TEA<sup>1</sup> (pH ≈ 7) bestimmt werden.

Die Reduktionsäquivalente **NADP/H** und **NAD/H** wurden (nach Matsumura, Miyachi 1980) in 0.1 N HCl (zur NADP-, bzw. NAD-Bestimmung) bzw. 0.1 N NaOH (zur NADPH-, bzw. NADH-Bestimmung) ebenfalls im Verhältnis 1:10 im Porzellan-Mörser homogenisiert. Zur Stabilisierung der oxidierten bzw. reduzierten Form wurden die Proben für die Dauer von 5 Min. auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen konnten sie durch Filtration (Gaze) und Zentrifugation geklärt werden. Die Proben wurden vor dem Messen mit HCl bzw. NaOH neutralisiert (pH ≈ 7).

Zur Bestimmung von **Glucose-6-Phosphat** wurde (nach Stitt et al. 1989) tiefgefrorenes Pflanzenmaterial in einem Verhältnis von 1:8 mit 8 %iger (w/v) Sulfosalicylsäure + 10 % (w/w) PVP bei 4 °C im Porzellanmörser homogenisiert. Nach Filtration und Zentrifugation konnte aus geklärtem Überstand nach Neutralisation mit TEA Glucose-6-Phosphat gemessen werden.

#### 2.5.1.2 Enzyme

Tiefgefrorenes Pflanzenmaterial wurde in den nachfolgenden Pufferlösungen bei 4 °C im Porzellanmörser homogenisiert. **Ascorbatperoxidase** (EC.1.11.1.11) wurde (nach Nakano, Asada 1981) in einem Puffergemisch aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 % (w/v) Sorbitol, 1 mM Ascorbat und 10 % (w/w) PVP) homogenisiert. **Katalase** (EC.1.11.1.6), **Peroxidase** (EC.1.11.1.7) und **Malatdehydrogenase** (EC.1.1.1.37) wurden (nach Omran 1980) in einem Puffergemisch aus 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7 und 10 % (w/w) PVP homogenisiert. **Glutathionreduktase** (EC.1.6.4.2), **Dehydroascorbatreduktase** (EC.1.8.5.1) und **Glucose-6-Phosphatdehydrogenase** (EC.1.1.1.49) wurden nach (Fricke 1991) in einem Puffergemisch aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM DTT, 5 mM Cystein-HCl, 0.5 mM EDTA und 10 % (w/w) PVP homogenisiert. Nach

---

<sup>1</sup> Zur einfacheren Handhabung wird TEA im Verhältnis 1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt.

Klärung durch Zentrifugation konnten Katalase, Malatdehydrogenase und Peroxidase direkt gemessen werden.

Da Katalase *in vivo* und *in vitro* sehr lichtempfindlich ist (Streb, Feierabend 1996), sollte der Lichteinfall bei der Aufarbeitung und vor allem während der Aufbewahrungszeiten weitgehend reduziert werden.

Zur Messung der Ascorbatperoxidase wurde der Extrakt ca. 5 Stunden bei 4 °C gegen einen Puffer, bestehend aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 % (w/v) Sorbitol und 1 mM Ascorbat, dialysiert.

Glutathionreduktase und Dehydroascorbatreduktase konnten ebenfalls erst nach einer Dialyse gegen ein Puffergemisch, bestehend aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.8 und 4 mM Mercaptoethanol gemessen werden. Die Dialyse sollte sich in diesem Fall über mind. 8 Stunden bei 4 °C erstrecken.

### 2.5.1.3 Proteine

Tiefgefrorenes Pflanzenmaterial wurde (nach Cooper 1981) im Verhältnis 1:5 in einem Puffergemisch aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 5 mM DTT bei 4 °C homogenisiert. Nach Klärung durch Zentrifugation wurde der Überstand zur Fällung der Proteine mit Ammoniumsulfat ( $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ) angereichert (80 % Endkonzentration). Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in Extraktionspuffer gelöst. Nach einer Dialyse (über Nacht) gegen ein Puffergemisch, bestehend aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.8 und 4 mM Mercaptoethanol, konnte der Proteingehalt (nach Bradford 1976) bestimmt werden.

### 2.5.1.4 Chlorophylle/Karotinoide

Frisches Pflanzenmaterial wurde (nach Porra 1989) in eiskaltem 80 %igen (v/v) Aceton in 25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 7 (dies vermindert die Phaeophytinbildung), im Polytron homogenisiert und anschließend durch Filtration und anschließender Zentrifugation geklärt. Der Extrakt wurde bis zur Messung gekühlt (4 °C) und dunkel aufbewahrt.

### 2.5.1.5 Gesamt-Antioxidantienkapazität

Die Gesamt-Antioxidantienkapazität von Blättern wird mittels zweier *radical-scavenging-assays* bestimmt.

#### a) NBT-assay

Im ersten *assay* (Grace et al. 1998) wurde die *scavenging*-Rate von **Superoxidradikalen** über die Inhibierung der **NBT**-Reduktion in Gegenwart eines Superoxidgenerierenden Systems beurteilt (s. auch 2.5.2.5).

Die Aufarbeitung des Blattmaterials erfolgte in einem 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7.4 bei 4 °C. Das Probenmaterial wurde im Verhältnis 1:5 in Puffer im Porzellan-Mörser homogenisiert. Nach anschließender Zentrifugation konnte direkt aus dem geklärten Überstand gemessen werden.

## b) DPPH-assay

Anhand des zweiten *assays* (Løvaas, Olsen 1998) wurde die *scavenging*-Kapazität eines methanolischen Blattextraktes über das Radikal **DPPH** bestimmt (s. auch 2.5.2.5). Das Probenmaterial wurde im Verhältnis 1:5 in Methanol bei 4 °C aufgearbeitet. Nach Zentrifugation konnte aus geklärtem Überstand direkt gemessen werden.

## 2.5.2 Messungen

### 2.5.2.1 Metaboliten

Die Bestimmung der oxidierten und reduzierten Formen des **Ascorbats** erfolgte nach Okamura (1980) Sie hierzu auch Abb. 3. Der Reaktionsansatz zur Bestimmung des Gesamt-Ascorbatgehaltes enthielt 60 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{PO}_4$ -Puffer, pH 7.5, 2 mM DTT - zur Reduktion des oxidierten Anteils an Ascorbat (c) - und 200  $\mu\text{l}$  mit 6 N NaOH neutralisierte Probe. Dieser Ansatz wurde 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, um

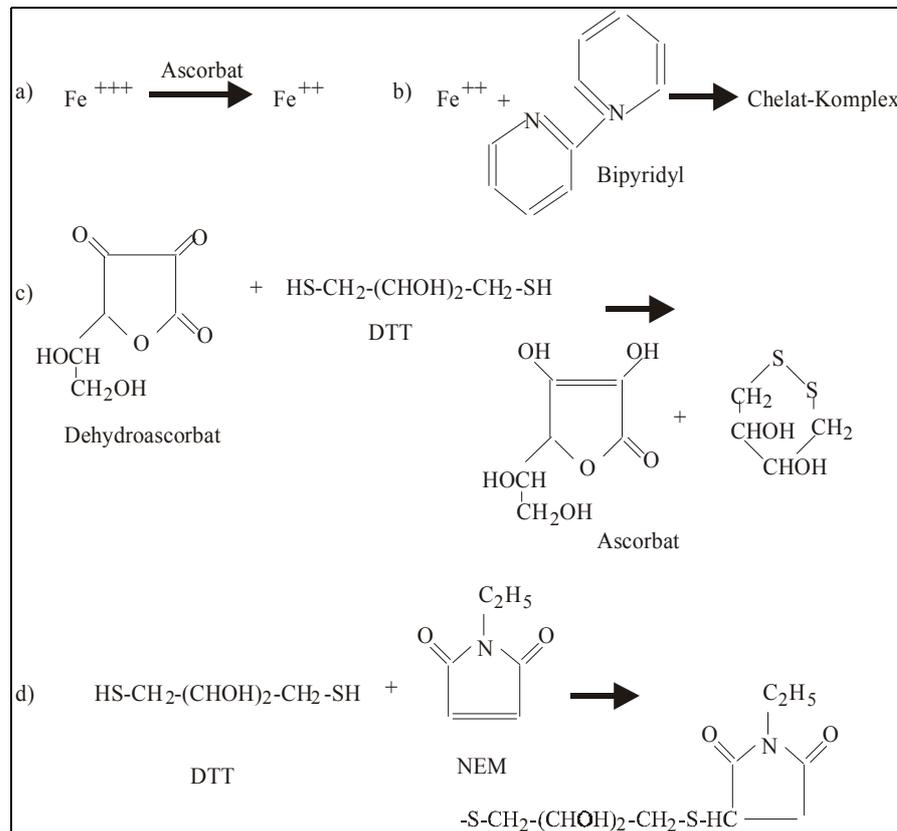
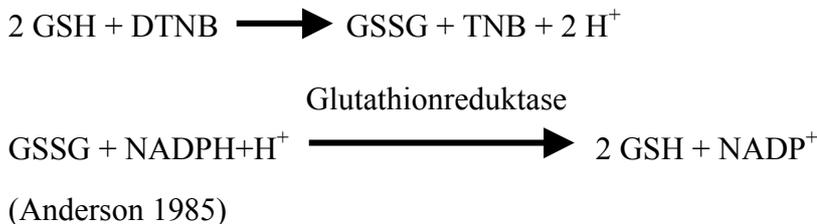


Abb. 3: Chemische Reaktionen bei der Ascorbatbestimmung mit Bipyridyl;  
Erklärungen siehe Text

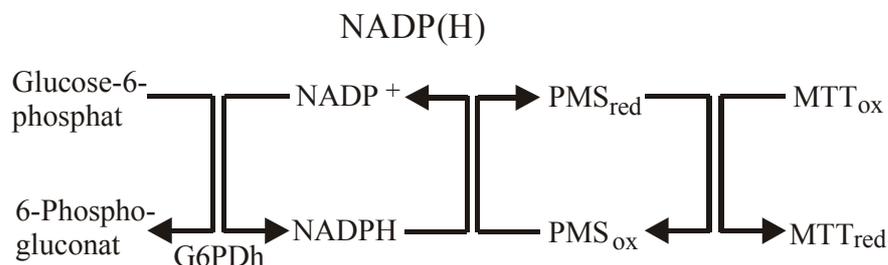
eine vollständige Reduktion zu gewährleisten. Mit 100  $\mu\text{l}$  einer 0.5 %igen NEM-Lösung wurde das zugegebene DTT im Versuchsansatz gebunden (d). Hinzu kamen 1 ml Farbreagenz, bestehend aus 0.7 % Bipyridyl in gleichen Anteilen von 70 %igem Ethanol, 42.5 %iger  $\text{H}_3\text{PO}_4$  und 10 %iger TCA. Im Anschluss erfolgte unter Schütteln die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  3 %iger  $\text{FeCl}_3$ -Lösung. Die  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen wurden durch Ascorbat

zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert (a). Diese bildeten mit Bipyridyl einen gefärbten Chelatkomplex (b), der nach einstündiger Inkubation bei 37 °C bei 546 nm spektrophotometrisch bestimmt wurde. Messungen von Standardkonzentrationen wurden mit reduziertem Ascorbat durchgeführt. Zur Bestimmung des Anteils von oxidiertem Ascorbat im Extrakt wurde die NEM-Lösung vor der Probe in das Puffer-Gemisch pipettiert, das übrige Verfahren entspricht dem oben beschriebenen.

**Glutathion** kann über einen *enzymic-recycling-assay* (Griffith 1980) bestimmt werden (siehe Reaktionsgleichungen). Das durch DTNB oxidierte GSH kann mittels NADPH in Anwesenheit von Glutathionreduktase wieder reduziert werden. Die Geschwindigkeit der TNB-Bildung wurde hierbei bei 405 nm spektrophotometrisch bestimmt. Der Gesamt-Glutathiongehalt wurde direkt aus der neutralisierten Probe gemessen. Der Anteil des oxidierten Glutathions wurde nach Derivatisierung mit 2-Vinylpyridin bestimmt. Dabei wurden 2 µl 2-Vinylpyridin pro 100 µl Probe eingesetzt. Das Reaktionsgemisch beinhaltete 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7.5, 4 mM EDTA, 0.2 mM NADPH, 0.6 mM DTNB und 0.5 U/ml Glutathionreduktase (Reaktionsstarter). Standardkonzentrationen wurden sowohl mit reduziertem als auch mit oxidiertem Glutathion gemessen.

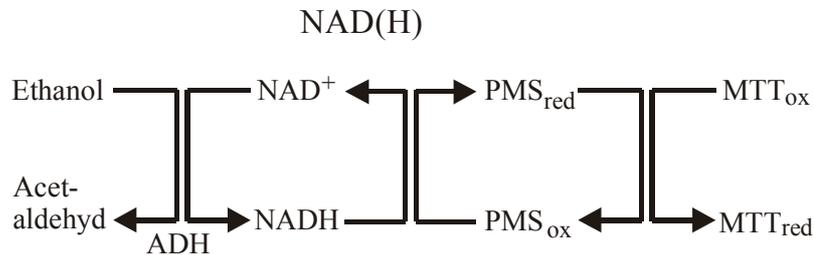


Die Bestimmung von **NADP** und **NADPH** erfolgte (nach Matsumura, Miyachi 1980) mittels einer Mischung aus MTT, PMS, Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDh). NADP wurde durch das Dehydrogenase-System reduziert. NADPH bildete, vermittelt durch PMS, reduziertes MTT (siehe Reaktionsgleichung). Die Geschwindigkeit der  $\text{MTT}_{\text{red}}$  Bildung wurde spektrophotometrisch bei 570 nm bestimmt. Das Reaktionsgemisch enthielt 100 mM Bicine-NaOH, pH 8, 2 mM EDTA, 0.2 mM MTT, 0.83 mM PMS, 500 mM Glucose-6-Phosphat und 0.78 U/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Reaktionsstarter). Standardkonzentrationen wurden mit NADP und NADPH gemessen.



Die Bestimmung von **NAD** und **NADH** erfolgte analog der oben genannten Methode (Matsumura, Miyachi 1980). Die Reduktion von NAD erfolgte über die Alkoholdehydrogenase und der Zugabe von Ethanol. Die darauf folgende Reaktion verläuft wie oben (siehe Reaktionsgleichung). Das Reaktionsgemisch enthielt 100 mM Bicine-

NaOH, pH 8, 2 mM EDTA, 0.2 mM MTT, 0.83 mM PMS, 500 mM Ethanol und 10 U/ml Alkoholdehydrogenase (ADH, Reaktionsstarter). Standardkonzentrationen wurden mit NAD und NADH gemessen.



**Glucose-6-Phosphat** kann (nach Stitt et al. 1989), vermittelt durch Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, unter Zugabe von NADP oxidiert werden. Dabei entstehen 6-Phosphogluconsäure und NADPH (siehe Reaktionsgleichung). Die Extinktionszunahme durch die NADPH-Entstehung wurde bei 366 nm spektrophotometrisch ermittelt. Das Reaktionsgemisch enthielt 100 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.33 mM NADP und 0,5 U/ml Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (Reaktionsstarter). Der Extinktionskoeffizient (mM) beträgt 3,4 (10<sup>3</sup> \* cm<sup>2</sup> \* mMol<sup>-1</sup>).

#### Glucose-6-(P)-Dehydrogenase



### 2.5.2.2 Enzyme

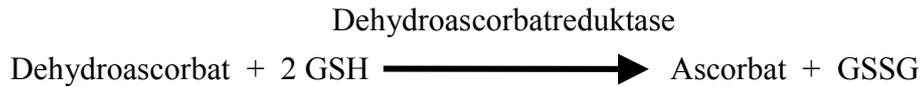
Zur Ermittlung der **Ascorbatperoxidase**-Aktivität (Nakano, Asada 1981; Asada 1992) wurde die Geschwindigkeit der Ascorbatverminderung durch Oxidation spektrophotometrisch bei 290 nm bestimmt. Katalysiert wurde diese H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelte Reaktion durch im Extrakt/Standard enthaltene Ascorbatperoxidase (siehe Reaktionsgleichung). Das Reaktionsgemisch enthielt 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM Ascorbat, 0.1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Reaktionsstarter). Die Berechnung erfolgte mittels des Extinktionskoeffizienten (mM) von 2.8 (10<sup>3</sup> \* cm<sup>2</sup> \* mM<sup>-1</sup>).

#### Ascorbatperoxidase

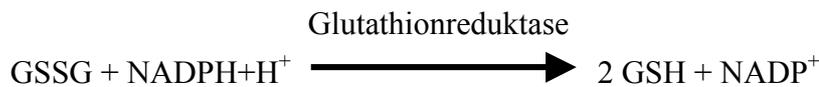


(Asada 1992)

Bei der Bestimmung der **Dehydroascorbatreduktase**-Aktivität (Nakano, Asada 1981) wurde die Geschwindigkeit der Ascorbatzunahme, vermittelt über die Dehydroascorbatreduktase, aus Dehydroascorbat bei 265 nm spektrophotometrisch gemessen. Das Reaktionsgemisch bestand aus 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM Glutathion (red.), 0.1 mM Dehydroascorbat. Die Reaktion wurde nach kurzer Inkubation mit Dehydroascorbat gestartet. Der für die genannten Bedingungen gültige Extinktionskoeffizient (mM) ist 14 (10<sup>3</sup> \* cm<sup>2</sup> \* mM<sup>-1</sup>).

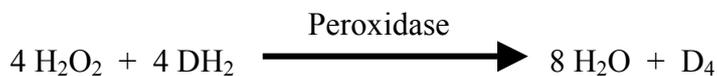


Die Aktivitätsbestimmung der **Glutathionreduktase** (Smith et al. 1988) erfolgte anhand eines „DTNB-*recycling-assays*“. Das oxidierte Glutathion konnte mittels NADPH und der in der zu messenden Probe befindlichen Glutathionreduktase reduziert werden. In dieser Form reagierte es mit DTNB (siehe Reaktionsgleichungen). Die Bildungsrate des dabei entstehenden TNB wurde spektrophotometrisch bei 405 nm gemessen. Das Reaktionsgemisch enthielt 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7.5, 0.2 mM NADPH, 0.6 mM DTNB, 1 mM GSSG (Reaktionsstarter). Die Berechnung erfolgte mittels des Extinktionskoeffizienten (mM) 13.6 (10<sup>3</sup> \* cm<sup>2</sup> \* mM<sup>-1</sup>).



(Smith et al. 1988)

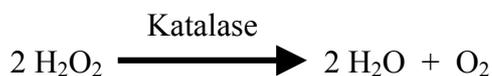
Die **Peroxidase**-Aktivität wurde mittels Guajacol spektrophotometrisch bei 436 nm bestimmt (Putter 1965). Das Reaktionsgemisch setzte sich aus 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7, 0.3 mM Guajacol und 0.12 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Reaktionsstarter) zusammen (siehe Reaktionsgleichung). Der Extinktionskoeffizient (mM) beträgt 25.5 (10<sup>3</sup> \* cm<sup>2</sup> \* mM<sup>-1</sup>; wobei zur Berechnung des Umsatzes von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das Ergebnis in μMol Guajacol mit 4, multipliziert wird da eine Komplexbildung erfolgt).



D<sub>4</sub> = Oktadehydrotetraguajacol

Die Messung der **Katalase**-Aktivität erfolgte nach Aebi (1984). Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spaltung durch Katalase (siehe Reaktionsgleichung) konnte direkt als Extinktionsabnahme bei 240 nm spektrophotometrisch bestimmt werden. Das Reaktionsgemisch enthielt 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7, und 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Der Extinktionskoeffizient (mM) beträgt 43,5 (10<sup>3</sup> \* cm<sup>2</sup> \* mM<sup>-1</sup>).



Die Aktivitätsbestimmung der **Malatdehydrogenase** erfolgte nach Bergmeyer, Brent (1983) sowie Smith (1983). Das Reaktionsgemisch setzte sich aus 100 mM TEA-Puffer, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM NADH und 1 mM Oxalacetat (Reaktionsstarter) zusammen. Die Extinktionsabnahme bei 334 nm als Folge der NADH-Oxidation in Verbindung mit gleichzeitiger Reduktion von Oxalacetat zu Malat konnte spektrophotometrisch bestimmt werden (siehe Reaktionsgleichung).

Der Extinktionskoeffizient (mM) für die Reaktion beträgt 6.18 (10<sup>3</sup> \* cm<sup>2</sup> \* mM<sup>-1</sup>).

### Malatdehydrogenase



Zur Ermittlung der **Glucose-6-Phosphatdehydrogenase**-Aktivität wurde die Zunahme der Extinktion bei 366 nm spektrophotometrisch bestimmt (nach Fickenscher, Scheibe 1986). Diese resultierte in der Zunahme von  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  durch die Reduktion von  $\text{NADP}^+$  bei gleichzeitiger Oxidation von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconsäure vermittelt durch die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (siehe Reaktionsgleichung). Das Reaktionsgemisch enthielt 50 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,33 mM NADP und 2 mM Glucose-6-Phosphat (Reaktionsstarter). Der Extinktionskoeffizient (mM) beträgt 3,4 ( $10^3 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mM}^{-1}$ ).

### Glucose-6-(P)-Dehydrogenase



## 2.5.2.3 Berechnung

Berechnung der **Substrat-Konzentration** bei mitgeführtem Standard:

$$c_p = c_{\text{St}} * \frac{E_p}{E_{\text{St}}}$$

Berechnung der **Substrat-Konzentration** bei Verwendung des Extinktionskoeffizienten:

$$c = \frac{\text{delta Extinktion}}{\text{Extinktionskoeffizient} * d} * \frac{\text{Vol}_K}{\text{Vol}_p} * \frac{\text{Vol}_E}{g \text{ (TG)}} * F \quad \left[ \frac{\text{mMol}}{g \text{ (TG)}} \right]$$

Berechnung von **Enzymaktivitäten**:

$$A = \frac{1000}{\text{Extinktionskoeffizient} * d} * \frac{\text{Vol}_K}{\text{Vol}_p} * \frac{\text{delta Extinktion}}{\text{Zeit (min)}} * \frac{\text{Vol}_E}{g \text{ (TG)}} \quad \left[ \frac{U}{g \text{ (TG)}} \right]$$

$c_p$  = Konzentration der Probe;

$E_p$  = Extinktion der Probe

delta Extinktion = Extinktionsdifferenz

$\text{Vol}_K$  = Gesamtvolumen in der Küvette

$\text{Vol}_E$  = Extraktvolumen

TG = Trockengewicht

1 U =  $1 \mu\text{Mol} * \text{min}^{-1}$

$c_{\text{St}}$  = Konzentration des Standards

$E_{\text{St}}$  = Extinktion des Standards

d = Schichtdicke der Küvette in cm

$\text{Vol}_p$  = Probevolumen

g = eingewogenes Pflanzenmaterial

F = Verdünnungsfaktor

#### 2.5.2.4 Proteine

Die Proteine wurden spektrophotometrisch bei 595 nm über die Farbreaktion mit Coomassie Brilliant Blue G-250 gemessen (Bradford 1976). 100 mg Coomassie Farbstoff wurden in 50 ml 95 %igen (v/v) Ethanol gelöst. Danach wurden 100 ml 85 %ige ortho-Phosphorsäure zugegeben und mit Aqua dest. auf 1 Liter aufgefüllt. Die Lösung war nach Filtration gebrauchsfertig.

Die zu messenden Extrakte wurden vor der Messung verdünnt. Mit Bovine Serum Albumin in 0,15 M NaCl-Lösung wurden Standardkonzentrationen gemessen.

#### 2.5.2.5 Chlorophylle/Carotinoide

Die Messung der Extinktion erfolgte in einem Spektralphotometer bei 663, 646 und 470 nm gegen ein entsprechendes Aceton/Puffer-Gemisch (80 % v/v Aceton in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7).

Zur Berechnung der Chlorophylle und Carotinoide dienten folgende Formeln (nach Urbach 1976):

$$\text{Chlorophyll a } [\mu\text{g} * \text{ml}^{-1} \text{ Extrakt}] = 12,21 * E_{663} - 2,81 * E_{646}$$

$$\text{Chlorophyll b } [\mu\text{g} * \text{ml}^{-1} \text{ Extrakt}] = 20,13 * E_{646} - 5,03 * E_{663}$$

$$\text{Carotinoide } [\mu\text{g} * \text{ml}^{-1} \text{ Extrakt}] =$$

$$\frac{1000 * E_{470} - 3,27 * \text{Chlorophyll a} - 104 * \text{Chlorophyll b}}{229}$$

#### 2.5.2.6 Gesamt-Antioxidantienkapazität

##### a) NBT-assay

Die Bestimmung der Gesamt-Antioxidantienkapazität (Abb. 4; nach Grace et al. 1998) über Inhibierung der **NBT** Reduktion erfolgte in einem Reaktionsgemisch aus 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7.4, 25 mM NBT, 78 mM NADH und Probe/Standard. Durch Zugabe von 10 mM PMS wurde die Reaktion, d.h., die Generierung von **Superoxidradikalen** gestartet. Die Zunahme von blau gefärbtem Formazan konnte bei 560 nm spektrophotometrisch ermittelt werden. Die Kalkulation der *scavenging*-Aktivität erfolgte anhand der Inhibierungsrate der Formazanbildung in Anwesenheit von Antioxidantien im Blattextrakt bzw. im Standard, relativ zu einer Kontrolle. Als Standard wurde Kaffeesäure und p-Cumarsäure eingesetzt.

##### b) DPPH- assay

Die Bestimmung der Gesamt-Antioxidantienkapazität über den **DPPH-assay** (nach Løvaas, Olsen 1998) erfolgte bei 514 nm spektrophotometrisch. Dabei wurde die *scavenging*-Aktivität des Extraktes über die Abnahme der Extinktion bestimmt. Diese Abnahme gründete im *scavenging* des DPPH Radikals über im Extrakt enthaltene Radikalfänger und dem damit einhergehenden Farbverlust. Das DPPH-Radikal selbst ist

in Lösung dunkel violett gefärbt. Das „Ausbleichen“ der DPPH-Lösung wurde über einen Zeitraum von 60 sec verfolgt. 200 µl der zu testenden Lösung wurden in eine Küvette pipettiert und diese im Photometer plaziert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 ml DPPH (100 µM in Methanol) gestartet. Bestimmt wurde die Extinktion von reinem DPPH in Methanol (Leerwert) zum Zeitpunkt t = 0 (A<sub>0</sub>), die Extinktion der Probe (A<sub>1</sub>) zum Zeitpunkt t = 0 und die Extinktion von DPPH + Probe nach 60 sec (A<sub>2</sub>). Über die folgende Beziehung konnte die *scavenging*-Aktivität ermittelt werden.

$$\text{nmol Radikalscavenger} = (A_0 + A_1 - A_2) * V/\epsilon$$

V = Gesamtvolumen des Messansatzes

$$\epsilon \text{ (mM)} = 12,51 (10^3 * \text{cm}^2 * \text{mM}^{-1})$$

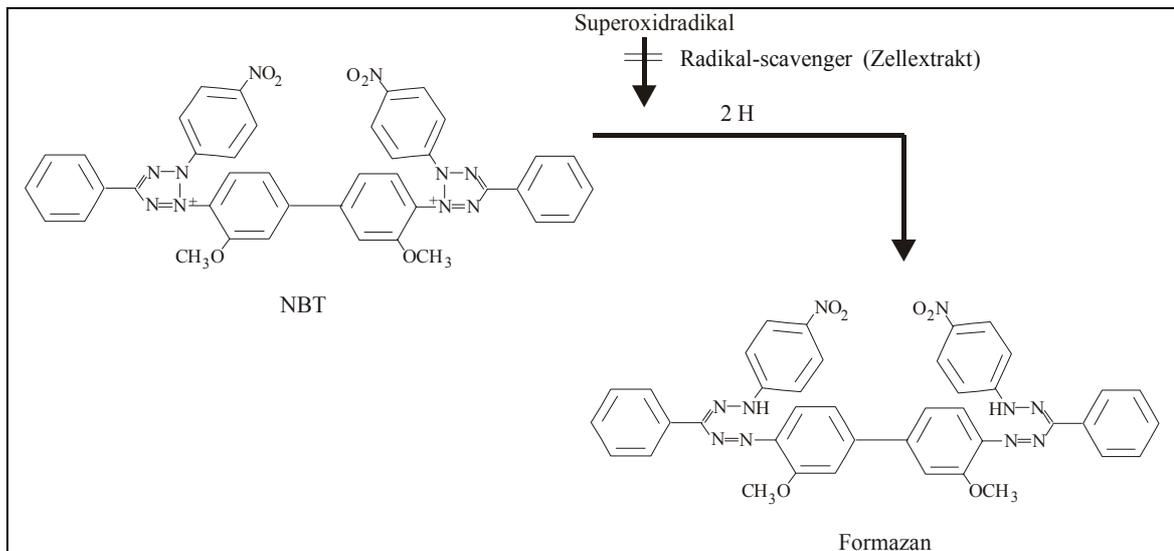


Abb. 4: Reduktion von NBT zur Formazan durch Superoxidradikale

## 2.6 Chloroplasten- und Protoplastenisolierungen

### 2.6.1 Chloroplasten

Die Chloroplastenisolierung erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Reeves, Hall (1973); Foyer, Halliwell (1976); Charles, Halliwell (1981).

Das Isolierungsmedium setzte sich folgendermaßen zusammen: 50 mM Hepes-KOH-Puffer, pH 7.6, 330 mM Sorbitol, 2 mM EDTA, 0.4 % BSA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 2 mM Ascorbat.

Frisches Pflanzenmaterial wurde grob zerkleinert und im Verhältnis 1:5 mit tiefgekühltem Puffergemisch versetzt. Danach wurde mit einem Polytron homogenisiert. Bei max. 2000 g wurden die Chloroplasten in der Zentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde mit Puffer gewaschen, um weitere Zellbestandteile zu entfernen. Im Anschluss wurde das Pellet in Puffer resuspendiert. Vor den anschließenden Metaboliten- und Enzymbestimmungen wurden die Chloroplastensuspensionen mit einem hyperosmotischen Medien verdünnt und auf dem Vortex gemischt, was ein Aufbrechen der Membranen

zur Folge hatte. Zur Bestimmung von Ascorbat wurde in HCl verdünnt, die Bestimmung der Ascorbatperoxidase erfolgte in einem Puffer aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 % Sorbitol (w/v), 1 mM Ascorbat. Die -Bestimmung der Metaboliten erfolgte direkt im Anschluss, die Messung der Enzymaktivitäten nach Dialyse gegen ein Puffergemisch (ca. 4 Stunden) bestehend aus: 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM DDT, 2 mM Mercaptoethanol, 2 mM Ascorbat.

## 2.6.2 Protoplasten

Protoplasten, per Definition isolierte „nackte“ Pflanzenzellen, wurden mittels eines Enzymgemisches, das Pektin und Cellulose abbauen kann, aus Blattgewebe gewonnen (Roby et al. 1991; Pladys et al. 1991; Potrykus, Shillito 1986; Robinson 1987).

Junge Blätter, die zu ca. 70-80 % entfaltet waren (minimierte Zellwandfestigkeit), wurden mit 70 % Ethanol und anschließend 5 % Natriumhypochlorid (in 1 % Tween-Wasser) oberflächensterilisiert. Die Blattunterseiten wurden unter Umgehung der größeren Blattadern mit einer scharfen Klinge eingeritzt (ca. 2 mm Abstand). Die derart behandelten Blätter wurden in Petrischalen in die Isolationslösung überführt. Diese isotonische Lösung bestand aus 5 mM MES-KOH, pH 6, 350 mM Mannitol, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 % Cellulase „Onozuka R-10“ und 0.2 % Macerozym R-10. Die Blätter wurden über Nacht (dunkel) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Grobe Bestandteile wurden aus der Suspension durch Filtration durch ein Nylonnetz (~ 85  $\mu\text{m}$   $\varnothing$ ) entfernt. Anschließend wurde bei 20 g für 5 Min. auf einer 19 %igen (w/v) Saccharose-Lösung zentrifugiert. Die intakten Protoplasten schwammen auf der Zuckerlösung und konnten mit einer Pipette (große Öffnung) vorsichtig abgesaugt werden. Die Protoplasten wurden nochmals mit Pufferlösung gewaschen und je nach weiterer Handhabung in obige Lösung oder Nährlösung (z.B. nach Murashige/Skoog) überführt.

## 2.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Das für die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen benötigte Pflanzenmaterial wurde über eine Karnovsky-Fixierung (in Anlehnung an Postek, Tucker 1976) mit anschließender Nachfixierung mit 1 %iger  $\text{OsO}_4$ -Lösung vorbereitet. Die Karnovsky-Fixierlösung setzte sich wie folgt zusammen: 7 ml 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer, 3 ml Paraformaldehyd-Lösung (0,06 g/ml) und 2 ml handelsübliche 50 %ige Glutaraldehyd-Lösung. Die Proben verblieben 30-45 Min. im Vakuum (200 mbar). Die Gesamtfixierdauer betrug ca. 12 Stunden bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Proben in einer *Acetonreihe* entwässert. Die folgenden „Entwässerungszeiten“ sind Richtwerte: je 2 Stunden in 30 % und 50 % Aceton, je 12 Stunden in 70 %, 90 %, 95 %, 100 % Aceton (in letzterem ist eine längere Aufbewahrung möglich). Darauf folgte die *critical-point*-Trocknung sowie das *sputtern* der Proben mit Gold im Vakuum (Böhler Fachberichte). Die elektronenmikroskopischen Arbeiten wurden in der ZBB der JLU-Giessen unter Anleitung von Frau Dr. Richter durchgeführt. Die Filmentwicklung wurde im dortigen Institut nach herkömmlichen Methoden vorgenommen. Die Bildentwicklung fand in Fachgeschäften statt.

## 2.8 Apoplastenfluidgewinnung und biochemische Analysen

Die Gewinnung des Apoplastenfluids erfolgte in Anlehnung an Husted, Schjoerring (1995) anhand Vakuuminfiltration und anschließender Zentrifugation.

Aus frischem Pflanzenmaterial wurden zur Vereinfachung der Oberflächenmessung sowie Infiltrationsratenbestimmung Blattscheiben mit 1 cm Durchmesser gestanzt. Diese wurden in eigens dafür konstruierten Schalen mit Halterung in isotonische Sorbitollösung (hier: 0.28 M) überführt und einem Vakuum von 100 mbar ausgesetzt. Der Vorgang des Ent- und Belüftens dauerte ca. 3 Min. und wurde 3-4 mal wiederholt. Geringe Infiltrationsraten erforderten die Belichtung der Blattscheiben zwischen den Vakuumbehandlungen. Nach Infiltration wurden die Blattscheiben vorsichtig trocken getupft und einzeln in Aluminiumfolien (ca. 1 cm breit) gewickelt. Diese wurden in speziellen Halterungen in Zentrifugenröhrchen plaziert. Es wurde max. 20 Min. bei 2000 g zentrifugiert. Das Apoplastenfluid wurde in Eppendorfgefäßen aufgefangen und im Anschluss je nach Bedarf in Vorbereitung der weiteren Bearbeitung in die entsprechenden Pufferlösungen pipettiert.

Die **Ascorbatperoxidase**-Bestimmung wurde nach Mischung des Apoplastenfluids im Verhältnis 1:2 mit 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 % (w/v) Sorbitol und 1 mM Ascorbat durchgeführt.

Die **Glutathionreduktase**- und **Dehydroascorbatreduktase**-Bestimmung erfolgte aus einer 1:2 Mischung mit 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM DTT, 5 mM Cystein-HCl und 0.5 mM EDTA.

**Peroxidase** und **Malatdehydrogenase** wurden nach versetzen des Fluids mit einem 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7 ebenfalls im Verhältnis 1:2 gemessen.

Zur **Protein**-Bestimmung wurde das Apoplastenfluid im Verhältnis 1:1 in ein Puffergemisch aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA und 5 mM DTT überführt.

Die Bestimmung von **Ascorbat** erfolgte nach Mischung von Fluid mit 0.1 N HCl (1:2) und die **Glutathion**-Messung konnte nach Versetzen der Probe mit 8 %iger (w/v) Sulfosalicylsäure (1:2) durchgeführt werden.

Die **Apoplastenfluid-Puffer-Gemische** wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und entsprechend den Angaben für die Gesamtblattanalysen weiter bearbeitet. Zur Messung der einzelnen Komponenten wurden unterschiedliche Volumina Fluid-Puffer-Gemisch benötigt. Im Einzelnen waren dies: Ascorbatperoxidase 100 µl, Glutathionreduktase 20 µl, Dehydroascorbatreduktase 100 µl, Peroxidase 20 µl, Malatdehydrogenase 5 µl und Ascorbat 200 µl. Die Glutathion-Bestimmung erfolgte nach Neutralisation mit TEA (pH ≈ 7) mit 150 µl Fluid-Puffer-Gemisch (Literatur siehe Kapitel 2.5.1 und 2.5.2).

Die Messung der Malatdehydrogenase-Aktivitäten zeigte eine evt. „Verunreinigung des Apoplastenfluids mit cytoplasmatischen Bestandteilen. Der eigene vorgegebene Grenzwert lag bei 2,5 % der Gesamtblattmalatdehydrogenase-Aktivität.

## 2.9 Radikalnachweis im Apoplasten

Das Vorkommen, bzw. die Akkumulation von ROS (*reactive oxygen species*) im Apoplasten Ozon-behandelter Pflanzen wurde über die Oxidation von Phenolrot ermittelt (Schraudner et al. 1998). Der zellimpermeable Farbstoff wurde ursprünglich zur Untersuchung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion von Makrophagen verwendet (Svalheim, Robertson 1993).

Frisches Blattmaterial der Versuchspflanzen wurde mit 10 mM MES-KOH, pH 6.5, gewaschen und anschließend wurden Stanzstücke gewonnen. Diese wurden in eine Lösung aus 0.14 mM Phenolrot in MES-KOH überführt und vakuumfiltriert (3 mal 1 Minute). Zur Vorgehensweise siehe 2.6. Im Anschluss wurde 1,5 Stunden im Licht bei 25 °C inkubiert. Mit den Stanzstücken wurde danach entsprechend der Anleitung zur Apoplastenfluid-Gewinnung (siehe Kapitel 2.6) weiterverfahren. Zu dem nach Zentrifugation gewonnenen Apoplastenfluid wurde 1 M NaOH (20 µl pro ml Apoplastenfluid) pipettiert, um die Reaktion zu stoppen. Das oxidierte Phenolrot konnte spektrophotometrisch bei 610 nm gemessen werden. Kontrollen waren: 1. Phenolrot in MES vor Lichtinkubation und 2. Phenolrot in MES-KOH nach 1,5 Stunden Inkubation im Licht.

Die Quantifizierung des oxidierten Phenolrot konnte bei 610 nm mittels dem Extinktionskoeffizienten von  $22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  erfolgen. Oxidiertes Phenolrot ist ca. 2 Stunden stabil.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Sichtbare Ozonschäden; ein Varietätenvergleich bei unterschiedlichen Ozonkonzentrationen

#### a) 30 ppb Ozon addiert zur Außenluft

Die über einen längeren Zeitraum durchgeführten Begasungen mit der „niedrigen“ Ozonkonzentration von 30 ppb bei gleichzeitigen geringen Ozonkonzentrationen in der Außenluft, führten primär zu verfrüht einsetzenden Seneszenzerscheinungen, wie dem Vergilben der Blätter (Veränderungen der Chlorophyllgehalte siehe 3.2.4) mit darauffolgendem frühem Blattabwurf. Der Varietätenunterschied und damit auch der unterschiedliche „Toleranzgrad“ äußerte sich hierbei in dem verzögerten Auftreten dieser Seneszenzerscheinungen bei *Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ (tolerant) unter Ozoneinfluss im Vergleich zu *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’ (sensitiv). Abb. 5 zeigt gleichaltrige Pflanzen der Varietät ‘Oregon’ unter Kontrollbedingungen (links) und Ozonbegasung (rechts).



Abb. 5: *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’ Pflanzen unter Kontrollbedingungen (links) und Ozoneinfluss (rechts) 4 Wochen nach Start der Versuchsreihe

Traten parallel zur oben genannten Ozonkonzentration Ozonereignisse der Außenluft auf, konnte bei ‘Oregon’ das verstärkte Erscheinen von Chlorosen gefolgt von den als

typischen Ozonschäden beschriebenen rötlichbraunen *stiplings* festgestellt werden. Diese tüpfelförmigen Läsionen erfassten im Laufe der Zeit die gesamte Blattoberfläche (Abb. 6).



Abb. 6: *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' mit den als „stiplings“ bezeichneten typischen Ozonschäden in unterschiedlichen Ausbreitungsgraden (links mit beginnenden Schäden und rechts mit ausgeprägtem Schadbild)

Auch hier war eine zeitliche Verschiebung des erstmaligen Auftretens innerhalb der Varietäten festzustellen (Tab. 1). Die tolerantere Varietät 'Tenderette' zeigte erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt derart ausgeprägte Schäden auf der Blattoberfläche. 24 Tage nach Start der Ozonbehandlung waren hier erste *stiplings* zu erkennen. Im Gegensatz dazu wurden diese bei der sensitiveren Varietät 'Oregon' schon nach 12 Tagen sichtbar. Auch hinsichtlich der Seneszenzerscheinungen zeigte sich die tolerante Varietät 'Tenderette' deutlich später betroffen als die sensitive Varietät 'Oregon'.

#### b) 50 ppb Ozon addiert zur Außenluft

Die Behandlung mit 50 ppb Ozon, addiert zur Außenluft, zeigte die Varietätenunterschiede zwischen *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' und *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' noch deutlicher. 10-12 Tage nach Beginn der Ozonbehandlung waren bei der Varietät 'Oregon' auf den ersten Folgeblättern großflächige Ozonschäden in Form deutlich ausgeprägter und mittlerweile großflächiger *stiplings* zu erkennen, während 'Tenderette' noch keine Veränderungen aufwies (Abb. 7).

Die deutlicheren Unterschiede traten somit bei der höheren Ozonkonzentration auf. Auch war in diesem Fall die in der Außenluft vorhandene „natürliche“ Menge an Ozon im Varietätenvergleich vernachlässigbar.

Tage nach Start der Ozonbehandlung	Vergleich des phänotypischen Erscheinungsbildes der <i>Phaseolus vulgaris</i> Pflanzen unter Ozonbehandlung (30ppb) und Kontrollbedingungen	
8	<p><b>Ozon:</b>  <i>Phaseolus vulgaris</i> 'Oregon': vereinzelte Chlorosen auf dem ersten Folgeblatt bei einigen wenigen Pflanzen, Turgeszenzverluste der Primärblätter;  <i>Phaseolus vulgaris</i> 'Tenderette': keine Veränderung gegenüber den Kontrollen</p>	<p><b>Kontrollen:</b>  keine Besonderheiten</p>
12	<p><b>Ozon:</b>  <i>Phaseolus vulgaris</i> 'Oregon': ein Großteil der Pflanzen zeigte Chlorosen auf dem ersten Folgeblatt, vereinzelt waren <i>stiplings</i> zu erkennen, eine Vergilbung der Primärblätter wurde deutlich;  <i>Phaseolus vulgaris</i> 'Tenderette': keine Veränderung gegenüber den Kontrollen</p>	<p><b>Kontrollen:</b>  keine Besonderheiten</p>
16	<p><b>Ozon:</b>  <i>Phaseolus vulgaris</i> 'Oregon': <i>stiplings</i> waren auf einem Großteil der Pflanzen zu erkennen, die Primärblätter waren weitgehend nekrotisch;  <i>Phaseolus vulgaris</i> 'Tenderette': es zeigten sich erste Turgeszenzverluste bei den Primärblätter</p>	<p><b>Kontrollen:</b>  keine Besonderheiten</p>
20	<p><b>Ozon:</b>  <i>Phaseolus vulgaris</i> 'Oregon': die Schäden breiteten sich aus und erfassten nun auch die nächste Blattetage, Abfall der Primärblätter;  <i>Phaseolus vulgaris</i> 'Tenderette': einige Folgeblätter (1. Blattetage) zeigten Chlorosen</p>	<p><b>Kontrollen:</b>  beide Varietäten:  es zeigten sich erste Turgeszenzverluste und erste Verfärbungen der Primärblätter</p>
24	<p><b>Ozon:</b>  <i>Phaseolus vulgaris</i> 'Oregon': bei einigen Pflanzen Abwurf der stark geschädigten Folgeblätter, die Schäden erfassten durchgehend mindestens 2 Blattetagen aller Pflanzen;  <i>Phaseolus vulgaris</i> 'Tenderette': erste <i>stiplings</i> waren an einigen Exemplaren auf den ersten Folgeblättern zu erkennen, die Primärblätter vergilbten deutlich</p>	<p><b>Kontrollen:</b>  beide Varietäten:  Vergilben der Primärblätter</p>
28	<p><b>Ozon:</b>  <i>Phaseolus vulgaris</i> 'Oregon': durchgehende Blattverluste;  <i>Phaseolus vulgaris</i> 'Tenderette': Ausbreitung der <i>stiplings</i>, Abwurf eines Teils der Primärblätter</p>	<p><b>Kontrollen:</b>  beide Varietäten:  deutliche Alterung der Primärblätter, Blattfall begann</p>

Tab. 1: Zeitlicher Verlauf der phänotypischen Veränderungen der *Phaseolus vulgaris* Pflanzen im Versuchszeitraum



Abb. 7: Phänotypisches Erscheinungsbild nach 14 Tagen unter Ozon (50 ppb); *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' zeigt im Vergleich zu *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' deutliche Schäden

### c) Verhältnis von Frischgewicht/Trockengewicht

Turgeszenzverluste drückten sich vor allem über das Verhältnis Frischgewicht/Trockengewicht aus, wenn sichergestellt war, dass Wachstumserscheinungen vernachlässigt werden konnten. Der Vergleich des Verhältnisses von Frischgewicht/Trockengewicht von vollständig entfalteten („ausgewachsenen“) Folgeblättern im Verlauf des Versuches zeigte eine sichtbare Verschiebung des Verhältnisses bei den begasteten Pflanzen. Im Vergleich der beiden Varietäten waren nur geringe Unterschiede zu erkennen, so dass nur von einer Tendenz einer stärkeren Verschiebung bei 'Oregon' gesprochen werden konnte (Abb. 8).

Weitere phänotypische Unterschiede der Varietäten z.B. bei Blüten- und Fruchtbildung waren nicht vorhanden. Die Entwicklung der Pflanzen verlief parallel. Eine Tendenz war im Bezug auf das Keimungsverhalten zu erkennen. Die Varietät 'Oregon' keimte im Durchschnitt geringfügig früher (1-2 Tage). Bereits mit der Entfaltung der Primärblätter waren diese geringfügigen Unterschiede zwischen beiden Varietäten jedoch wieder ausgeglichen.

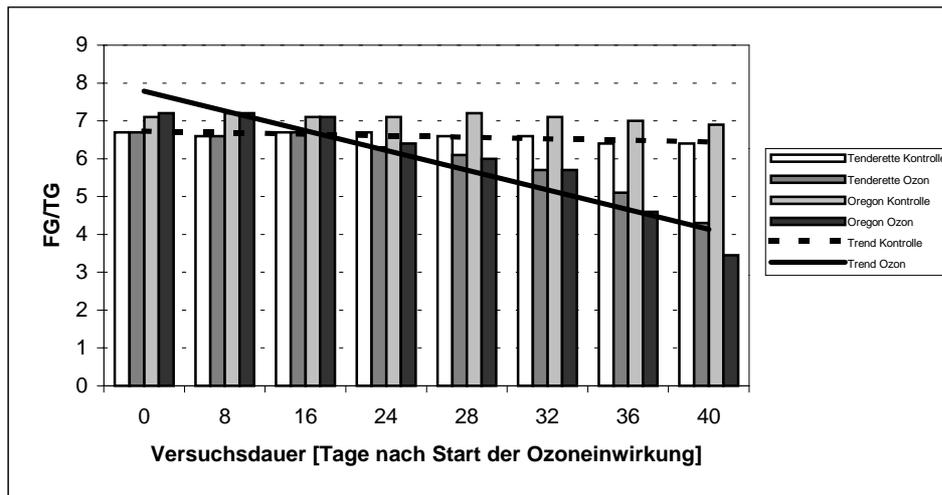


Abb. 8: Verschiebung des Frischgewicht/Trockengewicht-Verhältnisses unter Ozon im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 5); Trenddarstellungen (Berechnung durch Excel) des Vergleichs Kontrollen und ozonbehandelte Pflanzen

## 3.2 Gesamtblattanalysen

### 3.2.1 Metaboliten

#### a) Ascorbat

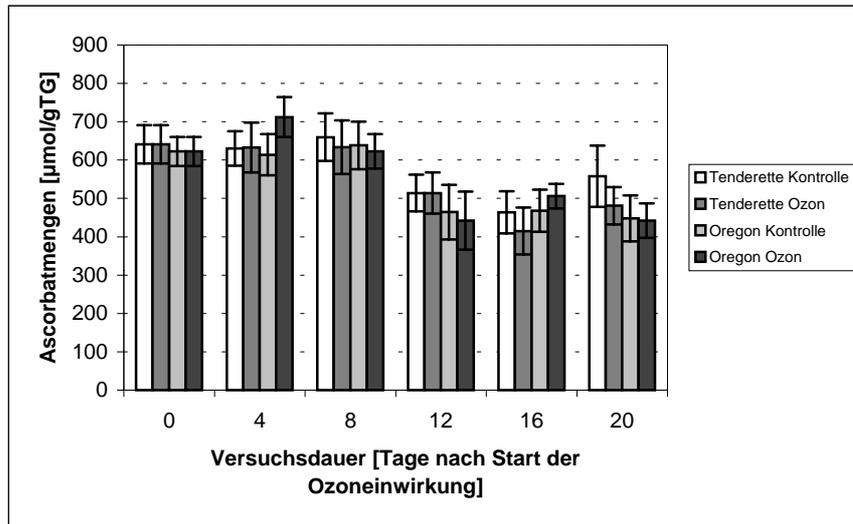


Abb. 9: Gesamtascorbatmengen ( $\text{Ascorbat}_{\text{red}}$  und  $\text{Ascorbat}_{\text{ox}}$ ) beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen ( $n = 4$ )

Die Gesamtascorbatmengen ( $\text{Ascorbat}_{\text{red}}$  und  $\text{Ascorbat}_{\text{ox}}$ ) von *Phaseolus vulgaris* lagen in der Größenordnung einiger hundert  $\mu\text{mol/g TG}$ . Sie zeigten sich zu Beginn des Versuches (bis zum 8. Tag) relativ konstant. Zwischen dem 8. und 12. Tag nach Einsetzen des Ozons war eine Abnahme der Ascorbatmenge zu verzeichnen. Danach waren mehr oder weniger größere Schwankungen erkennbar. Diese waren deutlich schwächer als zu Beginn des Versuches. Beide Varietäten zeigten nach der Ozonbehandlung keine Unterschiede in der Ascorbatmenge (Abb. 9).

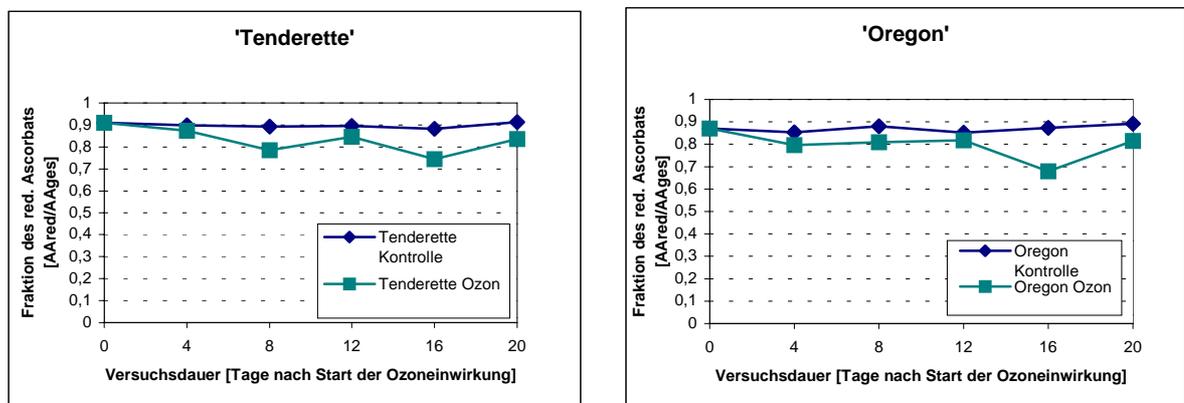


Abb. 10: Veränderungen der  $\text{Ascorbat}_{\text{red}}$ -Fraktion ( $\text{Ascorbat}_{\text{red}}/\text{Ascorbat}_{\text{gesamt}}$ ) beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen

Änderungen unter Ozoneinfluss waren im Ascorbat<sub>red</sub>/Ascorbat<sub>ox</sub>-Verhältnis zu erkennen. Unter Kontrollbedingungen lagen die Ascorbat<sub>red</sub>-Fraktion der Varietät 'Tenderette' bei 0,9 (90 % des Ascorbats lag in der reduzierten Form vor), die von 'Oregon' etwas unter 0,9. Diese Werte sanken bei 'Tenderette' zu Beginn der Begasung um 0,12 (8 Tage) und nach anschließendem leichten Anstieg erneut um 0,15 (16 Tage). Diesem folgte erneut ein Anstieg. Die Varietät 'Oregon' zeigte unter Ozon zu Beginn des Versuchs minimal kleinere Ascorbat<sub>red</sub>-Fraktionen (0,05). Eine deutliche Verschiebung von 0,2 war bei 16 Tagen zu verzeichnen (Abb. 10). Da die Gesamtascorbatmenge durch Ozon unbeeinflusst war, beruhen diese Veränderungen auf einer Zunahme des oxidierten Anteils des Ascorbats unter Ozoneinwirkung.

## b) Glutathion

Die Gesamtglutathionmengen (Glutathion<sub>red</sub> + Glutathion<sub>ox</sub>) von *Phaseolus vulgaris* lagen um den Faktor 50 unter der von Ascorbat (6 µmol/g TG). Deutliche Unterschiede in den Glutathionmengen zeigten sich zwischen beiden Varietäten bereits unter Kontrollbedingungen. Für 'Oregon' waren zu Beginn des Versuches (bis 8 Tage) um 35 % höhere Werte der Glutathionmengen zu verzeichnen. Ab dem 12. Tag änderten sich die Verhältnisse. Die Varietät 'Tenderette' hatte nun höhere Glutathionmengen. Ab dem 24. Tag waren keine Unterschiede mehr zu erkennen (Abb. 11). Mit zunehmendem Alter der Versuchspflanzen war ein Absinken der Glutathionmengen bei beiden Varietäten festzustellen. Dieses Absinken ging jedoch nicht kontinuierlich vonstatten. Vielmehr wurde im Bereich zwischen 8 und 12 Tagen eine Schwelle überschritten, die Werte sanken „sprunghaft“ um 50 % bei 'Tenderette' bzw. 75 % bei 'Oregon' (Abb.12).

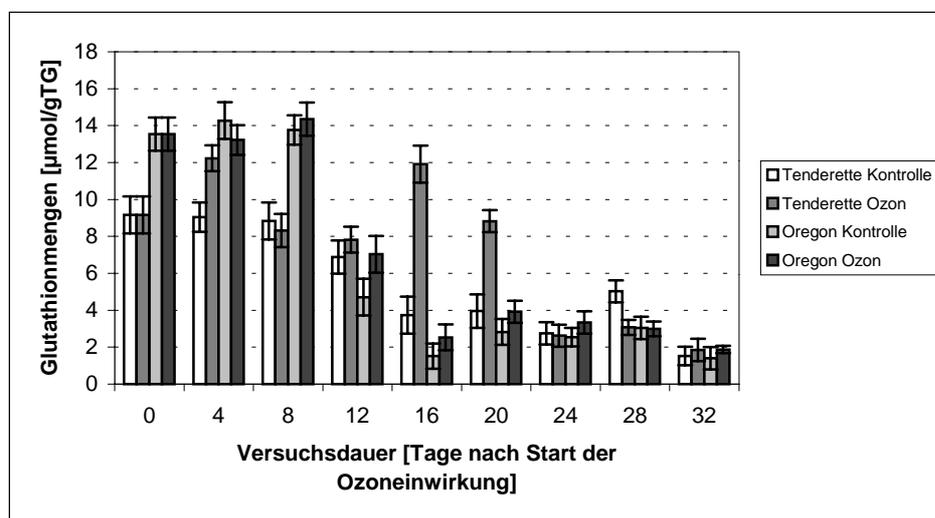


Abb. 11: Änderungen der Gesamtglutathionmengen beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Schwellenkurven siehe auch Abb. 12)

Deutliche Varietätenunterschiede wurden unter Ozoneinfluss sichtbar (Abb. 11). 'Tenderette' zeigte einen Anstieg der Glutathionmengen unter Ozon von ca. 25 % zu

Beginn des Versuchs. Dem folgte ein Zeitraum, indem keine Unterschiede zu den Kontrollen zu verzeichnen waren. Ab dem 16. Tag war ein erneuter Anstieg von 75 % erkennbar, diesem folgte eine Zunahme von 50 % bei 20 Tagen im Vergleich mit den Kontrollen. Zu Ende des Versuches wiesen Kontrollen und behandelte Pflanzen ähnliche Werte auf. Die Varietät 'Oregon' zeigte ebenfalls höhere Glutathionmengen unter Ozoneinfluss. Der maximale Anstieg betrug hier jedoch nur 30 % (12-16 Tage). Im Folgenden waren die Werte von Kontrollen und begasten Pflanzen ähnlich. Auch unter Ozon war das „sprunghafte“ Absinken der Werte zu beobachten. Die Schwelle wurde hierbei bei 'Oregon' ebenfalls im Bereich zwischen 8 und 12 Tagen überschritten, bei 'Tenderette' jedoch zu einem deutlich späteren Zeitpunkt im Bereich von 20 bis 24 Tagen (Abb. 12).

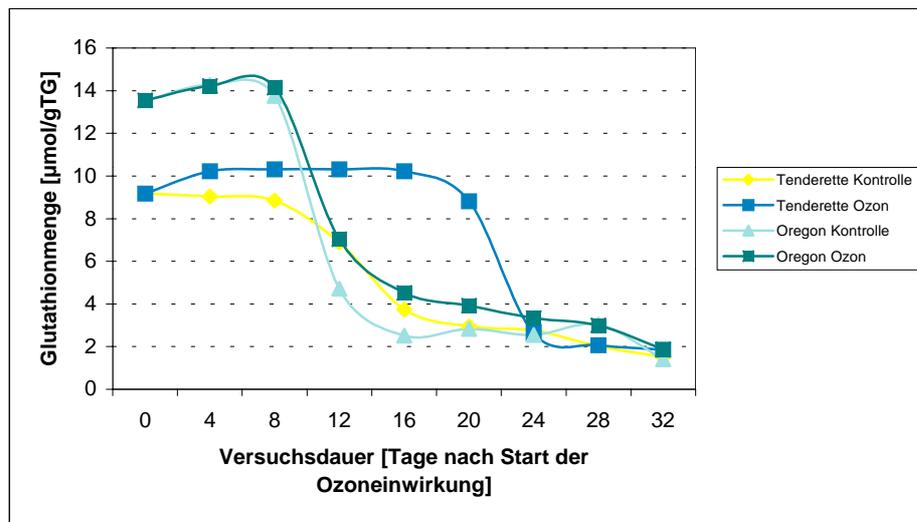


Abb. 12: Änderung der Gesamtglutathionmengen beider *Phaseolus* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollen; Darstellung zur Verdeutlichung der sprunghaften Niveauänderung sowie der zeitlichen Verschiebung der Schwellenwertüberschreitungen als Resultat der Ozonbehandlung bei 'Tenderette' im Vergleich zu 'Oregon'

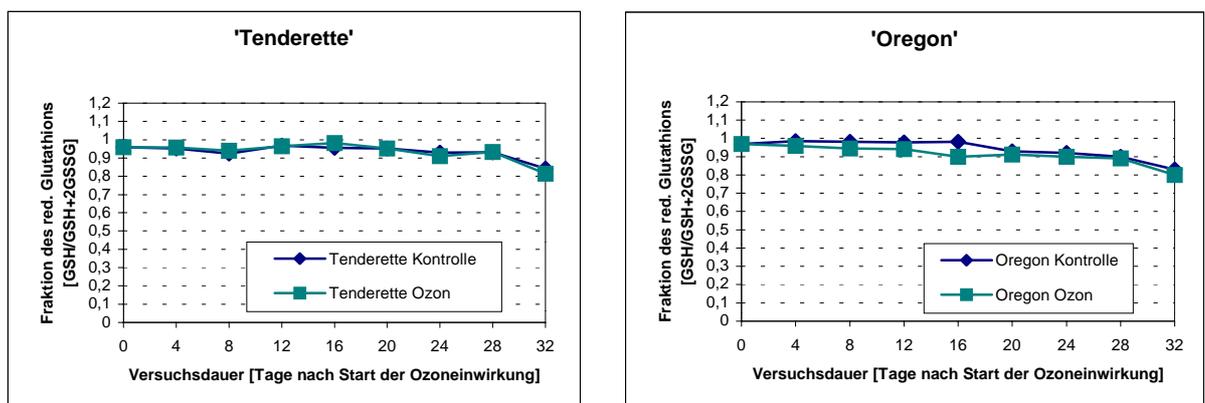


Abb. 13: Änderung der Glutathion<sub>red</sub>-Fraktion beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen  

$$\text{Glutathion}_{\text{red}}\text{-Fraktion} = \frac{\text{Glutathion}_{\text{red}}}{\text{Glutathion}_{\text{red}} + 2 \text{ Glutathion}_{\text{ox}}}$$

Hinsichtlich der Glutathion<sub>red</sub>-Fraktion ( $\text{Glutathion}_{\text{red}}/\text{Glutathion}_{\text{red}}+2\text{Glutathion}_{\text{ox}}$ ) war bei *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' kein Unterschied zwischen den Kontrollen und den ozonbehandelten Pflanzen zu erkennen. Die Werte lagen um 0,95 und fielen am Ende der Versuchsreihe auf 0,8. Auch *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' zeigte nur geringfügige Differenzen zwischen den Kontrollen (0,98) und den ozonbehandelten Pflanzen (0,94). Diese verschwanden ab dem 20. Tag (beide 0,9). Die weitere Alterung der Pflanzen führte zu einem Absinken der Werte auf 0,8 (Abb. 13).

### c) Coenzyme

Die zur Aufrechterhaltung nicht nur der antioxidativen Funktionen notwendigen Coenzyme (NADPH und NADH) lagen jeweils in Mengen um 200 nmol/g TG in der Zelle vor. Dies sind nochmals um den Faktor 50 geringere Werte als die des Glutathions.

- NADPH

Die NADPH+NADP-Mengen zeigten über die Zeit Schwankungen. Die jüngeren Pflanzen zeigten varietätenbedingte Unterschiede in den vorhandenen Mengen, wobei *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' tendenziell höhere Werte aufwies. Dieser Unterschied verschwand im Laufe des Versuchs (Alterung der Pflanzen). Ozoneinwirkung zeigte punktuelle Reduktionen der Mengen an Coenzymen bei beiden Varietäten zwischen 4 und 8 Tagen und im weiteren Verlauf bei 'Tenderette' auch bei 16 Tagen (Abb. 14). Die NADPH-Fraktion ( $\text{NADPH}/\text{NADPH}+\text{NADP}$ ) lagen um 0,25, d.h.,  $\frac{3}{4}$  der Gesamtmenge lag in oxidiert Form vor. Ozoneinfluss verursachte bei beiden Varietäten durchgehend niedrigere NADPH-Fractionen. Hierbei lagen die Werte von *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' ( $\bar{\varnothing}$  0,15) unter denen von *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' ( $\bar{\varnothing}$  0,2; Abb. 15).

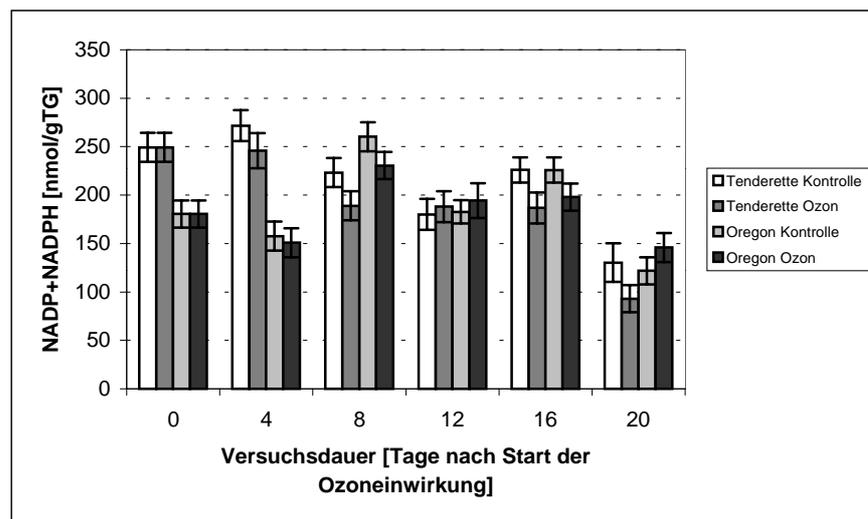


Abb. 14: Änderungen der NADPH+NADP-Mengen beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 4)

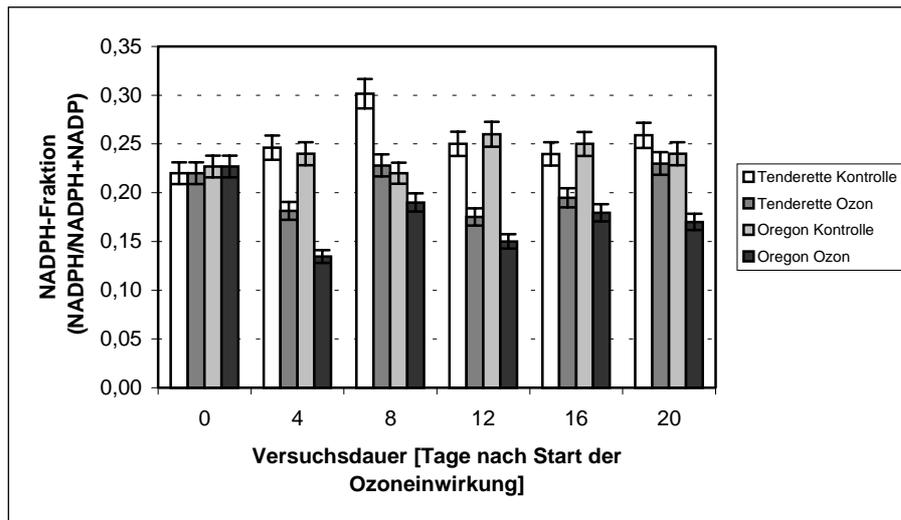


Abb. 15: Änderungen der NADPH-Fraktion (NADPH/NADPH+NADP) beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen

- NADH

Die NADH+NAD-Mengen zeigten bei beiden Varietäten Veränderungen über die Zeit, auch hier könnte eine Rhythmik zugrunde liegen. Tendenziell war eine Verminderung der Mengen im Versuchsverlauf zu erkennen ist. *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’ wies durchgehend niedrigere NADH+NAD-Mengen im Vergleich zu *Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ auf. Ozoneinfluss verursachte bei beiden Varietäten höhere NADH+NAD-Mengen (Abb. 16)

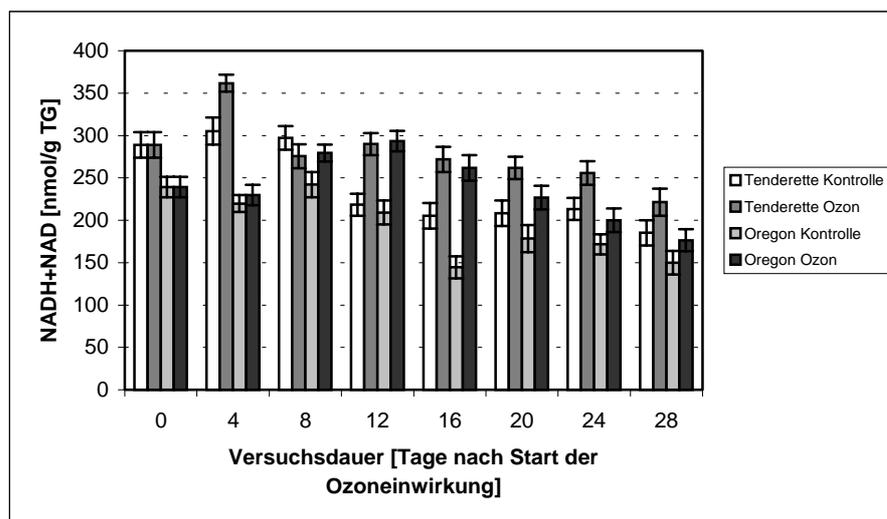


Abb. 16: Änderungen der NADH+NAD-Mengen beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen

Die NADH-Fractionen ( $\text{NADH}/\text{NADH}+\text{NAD}$ ) schwankten bei den Kontrollpflanzen von *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' zwischen 0.3 und 0.45, mit einem leichten Anstieg bei 4 Tagen und einem deutlichen Anstieg bei 24 Tagen. Die NADH-Fraktion von 'Oregon' lagen unter denen von 'Tenderette', bei Werten von 0.25 und zeigte ebenfalls Schwankungen.

Ozoneinfluss resultierte bei der Varietät 'Tenderette' in einem Abfall der NADH-Fraktion um ca. 15-20%. 'Oregon' zeigte ein sehr heterogenes Verhalten unter Ozon. Hierbei wechselten sich geringe und höhere NADH-Fractionen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen ab (Abb. 17).

Im Gegensatz zu der bei den  $\text{NADH}+\text{NAD}$ -Mengen zu verzeichnenden Abwärtstendenz war bei der NADH-Fraktion eine Aufwärtstendenz im Verlauf des Versuches zu erkennen.

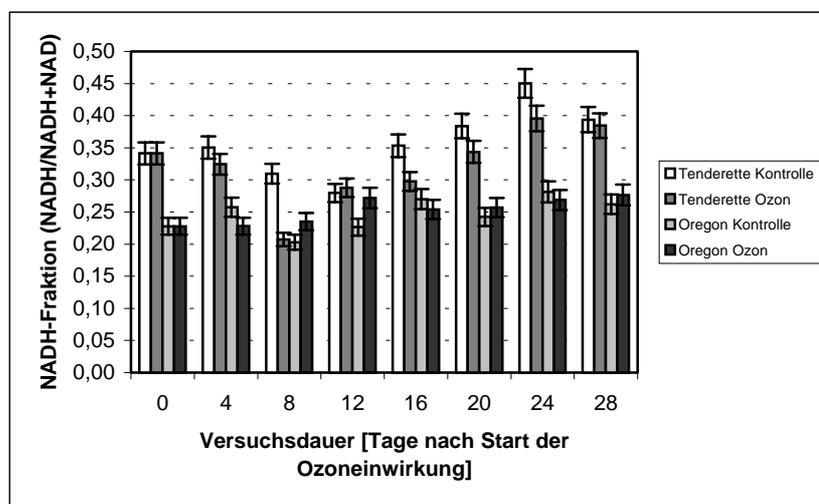


Abb. 17: Änderungen der NADH-Fraktion ( $\text{NADH}/\text{NADH}+\text{NAD}$ ) beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen

#### d) Glucose-6-Phosphat

Glucose-6-Phosphat als zentraler Elektronendonator für die cytoplasmatische NADPH-Bildung (Pentose-Phosphat-Weg) lag im Bereich von 2,5-4  $\mu\text{mol/g}$  TG in der Pflanze vor (Abb. 18). Die Veränderungen der Glucose-6-Phosphat-Mengen über die Zeit verliefen bei beiden Varietäten nicht kontinuierlich. Vielmehr war auch hier das Überschreiten einer Schwelle im Bereich zwischen 8 und 12 Tagen zu beobachten (Abb. 19, durch Pfeile gekennzeichnet). Der Level der Glucose-6-Phosphat-Menge lag zu Beginn des Versuches um 4  $\mu\text{mol/g}$  TG und fiel in dem bereits erwähnten Bereich auf Werte um 2,5  $\mu\text{mol/g}$  TG.

Im Varietätenvergleich zeigte sich, dass *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' unter Kontrollbedingungen geringfügig höhere Glucose-6-Phosphat-Mengen aufwies. Dieser Unterschied verschwand zu Ende der Versuchsreihe (Abb. 18).

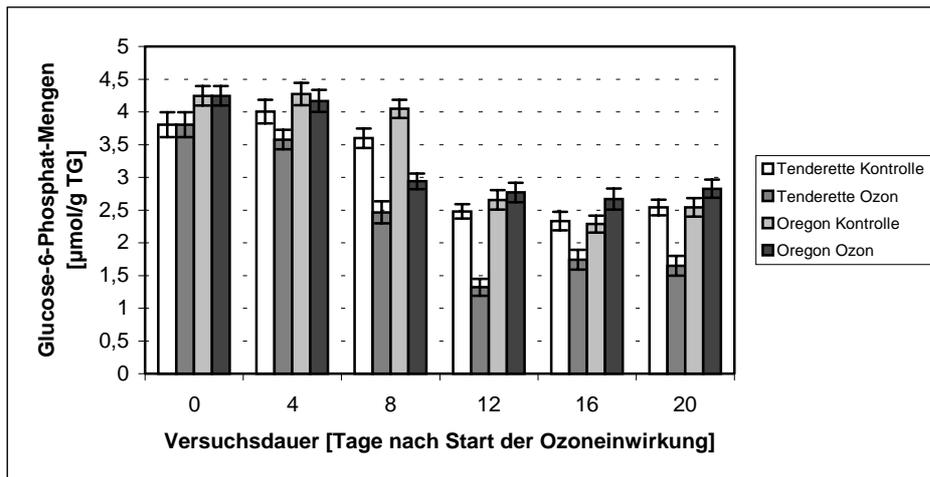


Abb. 18: Änderungen der Glucose-6-Phosphat-Mengen beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Schwellenüberschreitungen und Plateauverschiebungen siehe auch Abb. 19)

Ozoneinfluss resultierte in einem sehr heterogenen Verhalten beider Varietäten. ‘Tenderette’ zeigte durchgehend niedrigere Glucose-6-Phosphat-Mengen. Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen war ein Abfall von 10 % zu Beginn, über 30-50 % im mittleren Bereich der Versuchsreihe und um 20-30 % am Ende zu ermitteln. ‘Oregon’ zeigte zu Beginn einen Abfall der Glucose-6-Phosphat-Mengen von bis zu 25 % im Vergleich zu den Kontrollen. Im weiteren Verlauf jedoch stiegen die Glucose-6-Phosphat-Menge

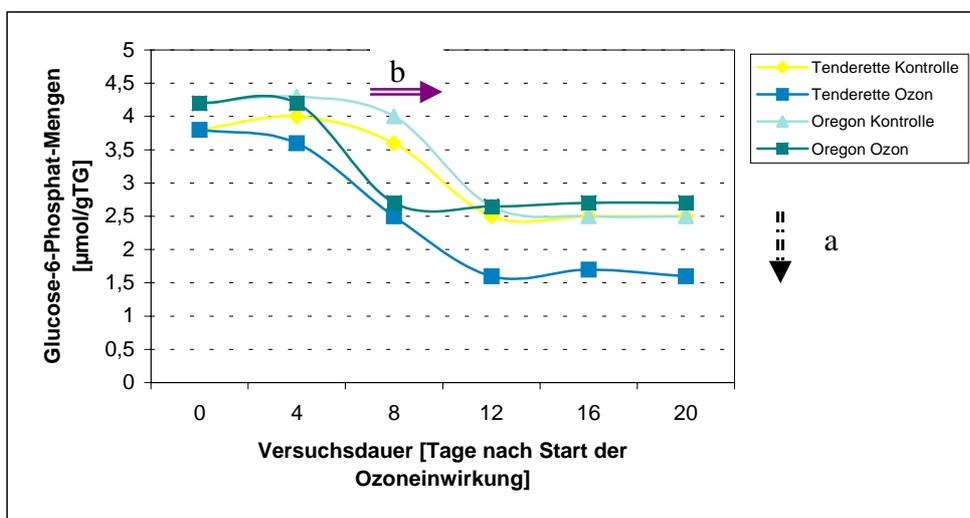


Abb. 19: Änderungen der Glucose-6-Phosphat-Mengen beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen; Darstellung zur Verdeutlichung a) der Verschiebung (⋮=▶) des Plateaus nach Überschreitung der entsprechenden Schwelle bei *Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ nach Ozonbehandlung und b) zeitliche Verschiebung (⇨) der Schwellen bei beiden *Phaseolus vulgaris* Varietäten als Resultat der Ozoneinwirkung im Vergleich zu den Kontrollen

unter Ozoneinfluss gegenüber den Kontrollen um Werte von ca. 10 % an (Abb. 18). Die Ozonbehandlung resultierte darüber hinaus in einer zeitlichen Verschiebung der Schwellenüberschreitung. Bei beiden *Phaseolus vulgaris* Varietäten fand sie im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zeitlich früher statt. Zudem war eine Absenkung des Plateaus nach Überschreiten der Schwelle bei 'Tenderette' nach Ozonbehandlung zu erkennen (Abb. 19).

### 3.2.2 Enzyme

#### a) Ascorbatperoxidase

Der Verlauf der Änderung der Ascorbatperoxidase-Aktivität über die Zeit war bei beiden *Phaseolus vulgaris* Varietäten vergleichbar. Die Kontrollpflanzen zeigten einen Anstieg zu Beginn des Versuches, diesem folgte nach Durchlaufen eines Maximums bei 8 Tagen eine deutliche Abnahme der Aktivität. Aufgrund des breiteren Maximums bei *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' fand diese Abnahme zeitlich versetzt um 4 Tage statt. Unterschiedlich waren die absoluten Aktivitätswerte. Sie lagen bei *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' im Schnitt um 70 % über denen von *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' (Abb.20).

Ozon bewirkte bei beiden Varietäten ab dem 8. Tag eine Erhöhung der Enzymaktivität. Dies wurde besonders im Bereich von 12-20 Tagen deutlich. Dem kontinuierlichen Aktivitätsverlust bei den Kontrollen stand hier eine nochmalige Erhöhung in den ozonbehandelten Pflanzen gegenüber. Daraus ergab sich ein deutlich nivelliertes Maximum. Die Aktivitätserhöhung betrug bei *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' 65 % nach 16 Tagen und 100 % nach 20 Tagen. Bei *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' war bereits ab dem 12. Tag eine deutliche Erhöhung von 50 % zu verzeichnen. Diese stieg auf 180 % nach 16 Tagen und betrug immerhin noch 110 % nach 20 Tagen (Abb. 20).

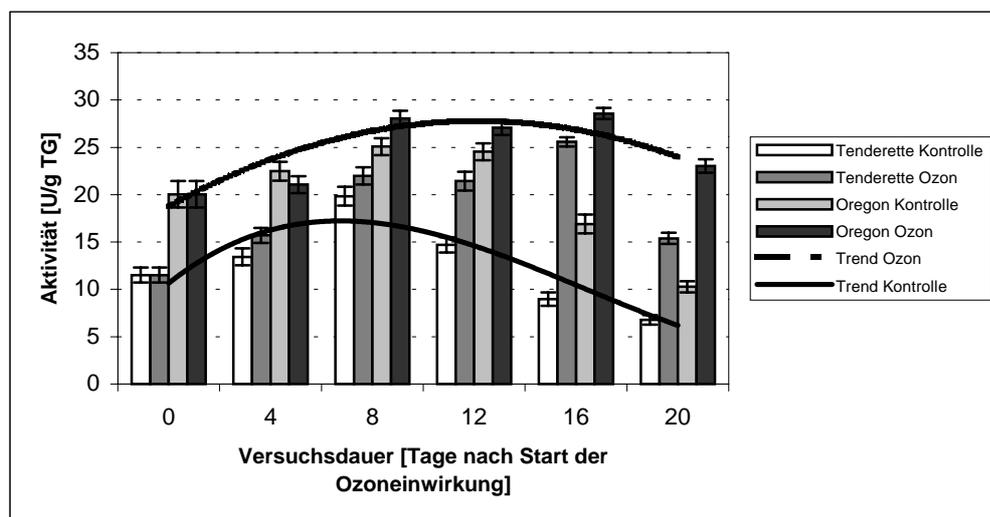


Abb. 20: Änderungen der Ascorbatperoxidase-Aktivitäten beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen und Trenddarstellungen (Berechnung durch Excel)

## b) Dehydroascorbatreduktase

Der zeitliche Verlauf der Aktivitätsänderung der Dehydroascorbatreduktase war bei beiden Varietäten unter Kontrollbedingungen annähernd identisch. Die Aktivität wurde im Laufe der Alterung der Blätter gering und sank auf  $\frac{1}{4}$  der Ausgangsaktivität. Dieser zeitliche Verlauf war auch bei den ozonbehandelten Pflanzen zu erkennen. Er ging auch hier nicht kontinuierlich vonstatten, vielmehr wurde im Bereich zwischen 12 und 16 Tagen eine Schwelle überschritten, was eine unmittelbare deutliche Abnahme der Aktivität des Enzyms mit sich brachte. Bei *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' zeigten tendenziell geringere Aktivitäten bei den behandelten Pflanzen. 'Tenderette' dagegen

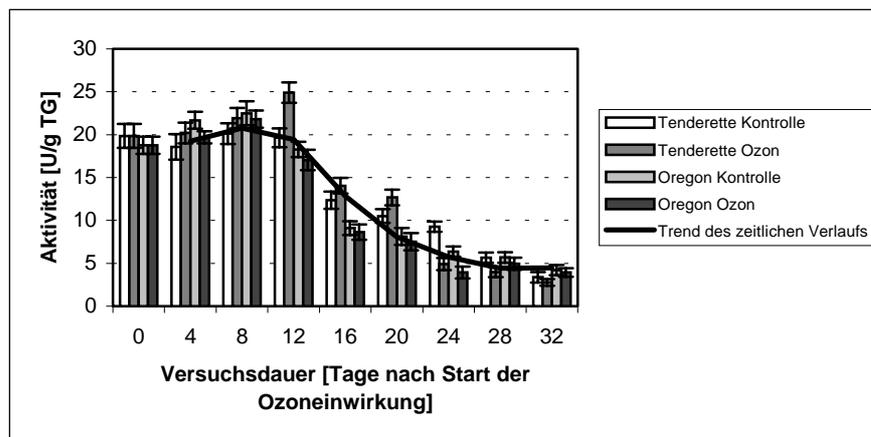


Abb. 21: Änderung der Dehydroascorbatreduktase-Aktivität beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen und Trenddarstellung (Berechnung durch Excel) des zeitliche Verlaufs. Im Bereich von 12 bis 16 Tagen nimmt die Aktivität nach überschreiten einer Schwelle verstärkt ab (n = 5).

wies zu Beginn der Versuchsreihe die Tendenz einer geringfügig erhöhten Dehydroascorbatreduktase-Aktivität unter Ozonbeeinflussung auf. Die maximale Erhöhung bei 12 Tagen betrug hier 30 % (im Vergleich zu 10 % bei den übrigen Zeiträumen). Zu Ende der Versuchsreihe sanken die Aktivitätswerte auch bei der ozonbehandelten Varietät 'Tenderette' unter die der Kontrollen (Abb. 21).

## c) Glutathionreduktase

Auch für die Glutathionreduktase-Aktivität zeigte sich eine Abnahme im Verlauf des Versuchs bei beiden *Phaseolus vulgaris* Varietäten. Von zu Beginn um 20 U/g TG sank die Aktivität auf  $\frac{1}{10}$  des Ausgangswertes. Der Verlauf entsprach demjenigen, der bereits für die Dehydroascorbatreduktase beschrieben wurde (Überschreitung einer Schwelle und nachfolgend verstärkte Aktivitätsverluste, Abb. 23). Unter Ozon zeigten sich bei beiden Varietäten erhöhte Aktivitätswerte. Diese waren bei *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' im Bereich von 8-16 Tagen zuerst um 25 % später sogar um 60 % erhöht. Bei *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' war im Bereich von 8-20 Tagen eine erhöhte

Glutathionreduktaseaktivität zu verzeichnen. Hier zeigte sich über die Zeit eine kontinuierlich höhere Aktivität von anfangs ca. 25 % (8 Tage) bis zu 90 % bei 20 Tagen (Abb. 22). Für den zeitlichen Verlauf zeigte sich hierbei, dass es in Folge der Ozonbehandlung zu einer zeitlichen Verschiebung der Schwellenüberschreitung kam. Deutete sich bei *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' schon bei den Kontrollpflanzen an, dass vor Erreichen der Schwelle ein Maximum durchlaufen wurde, so war dieses bei beiden Varietäten unter Ozon noch deutlicher erkennbar (Abb. 23)

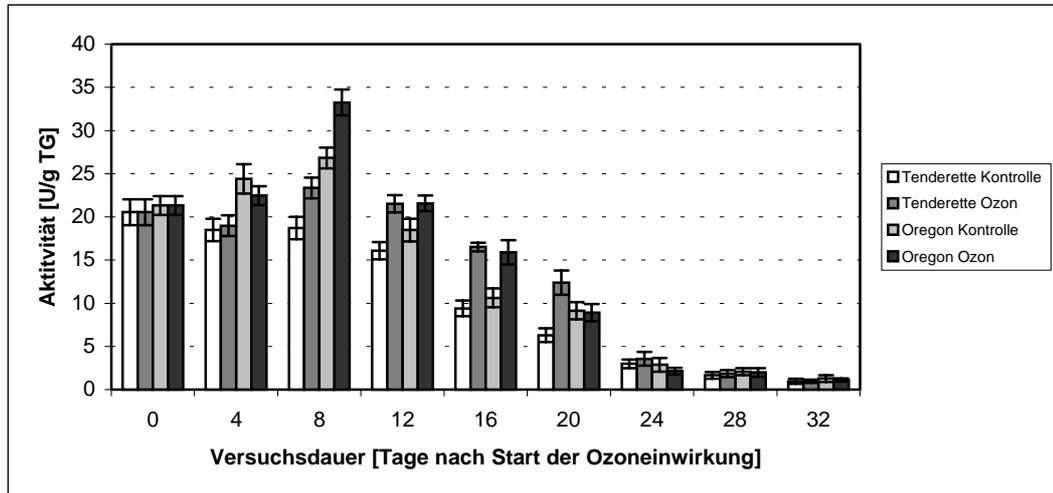


Abb. 22: Änderung der Glutathionreduktase-Aktivität beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 5)

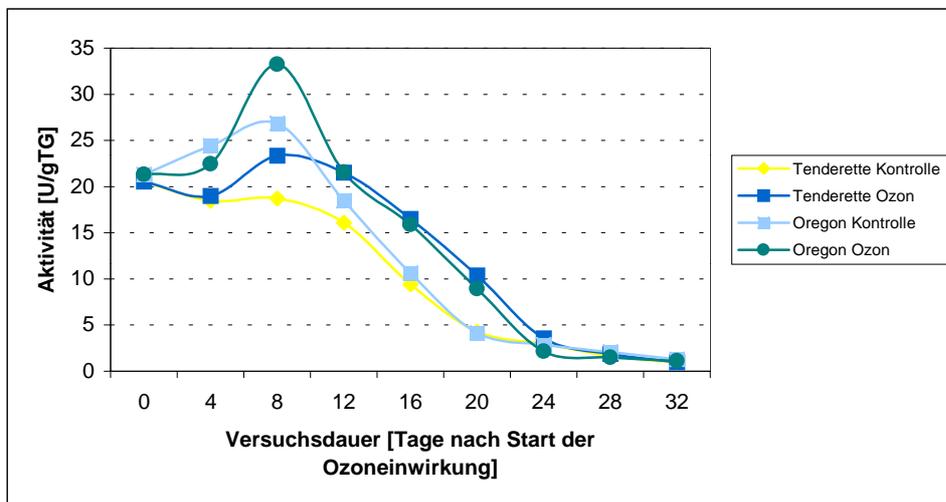


Abb. 23: Änderung der Glutathionreduktase-Aktivität beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen; dem Durchlaufen eines Maximums (vor allem als Resultat der Ozonbehandlung) folgt das Überschreiten einer Schwelle und darauffolgend starke Aktivitätsverluste des Enzyms; Ozon resultiert in einer zeitlichen Verschiebung dieser Schwelle

#### d) Unspezifische (Guajacol-abhängige) Peroxidase

Die Werte für die Peroxidase-Aktivität zeigten sich im Versuchszeitraum sehr heterogen. Der zeitliche Verlauf der Aktivitätsänderungen von *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' zeigte relativ konstante Werte um 60 U/g TG. Für *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' fanden sich Schwankungen mit Maxima an 4 und 12 Tagen von 152 (4) und 185 (12) U/g TG.

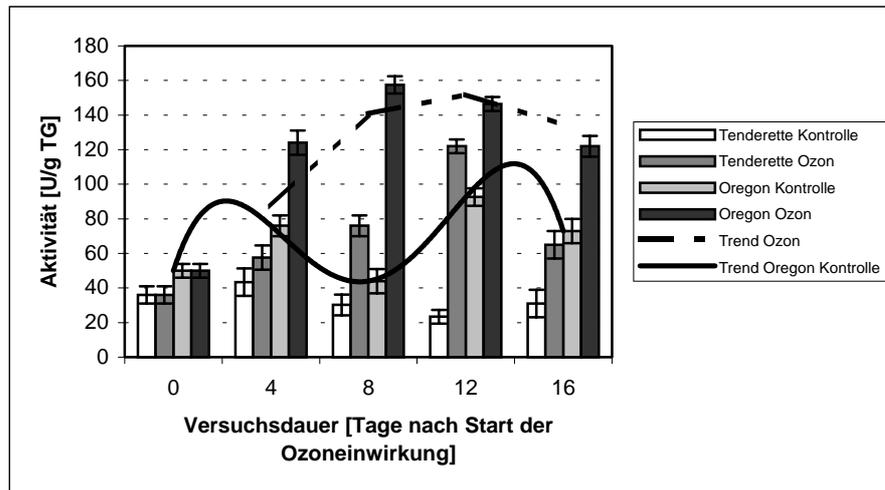


Abb. 24: Änderungen der Peroxidase-Aktivität (unspez. Guajacol-abhängige Peroxidase) beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 5) und Trenddarstellungen des zeitlichen Verlaufs

Unter Kontrollbedingungen waren deutlich höhere Aktivitätswerte bei 'Oregon' zu verzeichnen. Die Schwankungen, die sich bei 'Tenderette' andeuteten, waren bei 'Oregon' stärker ausgeprägt. Sie verliefen jedoch bei den beiden Varietäten nicht synchron. Welche Rhythmik diesen Schwankungen zugrunde lag konnte nicht ermittelt werden. Unter Ozoneinfluss war bei der Varietät 'Tenderette' ein deutlicher Aktivitätsanstieg zu erkennen. Dieser rangierte bei 30 % nach 4 Tagen und bei maximal 400 % nach 12 Tagen. Für die Varietät 'Oregon' war ein ebenso deutlicher Anstieg unter Ozoneinfluss zu erkennen. Dieser betrug im Maximum 260 %. Die Aktivitätswerte durchliefen im Bereich zwischen 8 und 12 Tagen ('Oregon'), bzw. um 12 Tage ('Tenderette') ein Maximum. Eine evt. Rhythmik war nicht mehr zu erkennen, sie wurde ggf. überdeckt (Abb. 24).

#### e) Katalase

Die Katalase-Aktivität beider Varietäten lag unter Kontrollbedingungen relativ konstant um 110 U/g TG und nahm zu Ende der Versuchsreihe um ca. 40 % ab. Ozoneinfluss resultierte bei *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' in einem Anstieg der Katalase-Aktivität um 25 % bei 8 Tagen und über 100 % bei 16 Tagen. *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' zeigte einen deutlichen Abfall der Aktivität um 40 % (4 Tage), gefolgt von einem noch deutlicheren Anstieg gegenüber des Kontrollwertes von 150 % (8 Tage). Zum Ende der Versuchsreihe war auch hier ein Abfall der Aktivität zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu

war bei der Varietät ‘Tenderette’ unter Ozoneinfluss ein nochmaliger Anstieg zu erkennen (Abb. 25).

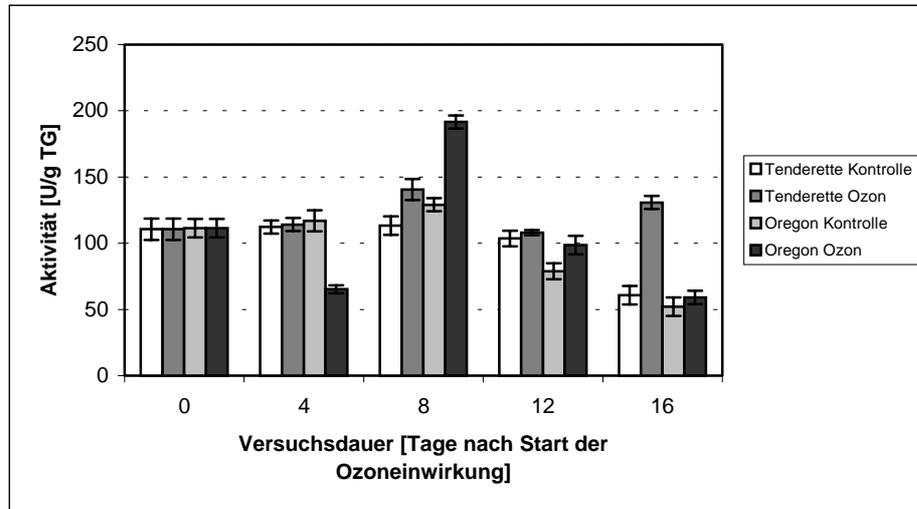


Abb. 25: Änderungen der Katalase-Aktivität beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 5)

#### f) Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität waren unter den verschiedenen Versuchsbedingungen deutliche Varietätenunterschiede zu erkennen. *Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ zeigte unter Kontrollbedingungen relativ konstante Aktivitätswerte um 3 U/g TG. Ozon hatte keinen Einfluss auf die Aktivität. Deutlichere Unterschiede waren bei *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’ zu verzeichnen. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich eine kontinuierliche Aktivitätszunahme von 4 U/g TG auf 11 U/g TG. Ozoneinfluss resultierte in einer gesteigerten Aktivität nach 8 Tagen (+ 40 %) und einem Aktivitätsverlust von 60 % nach 16 Tagen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Abb. 26).

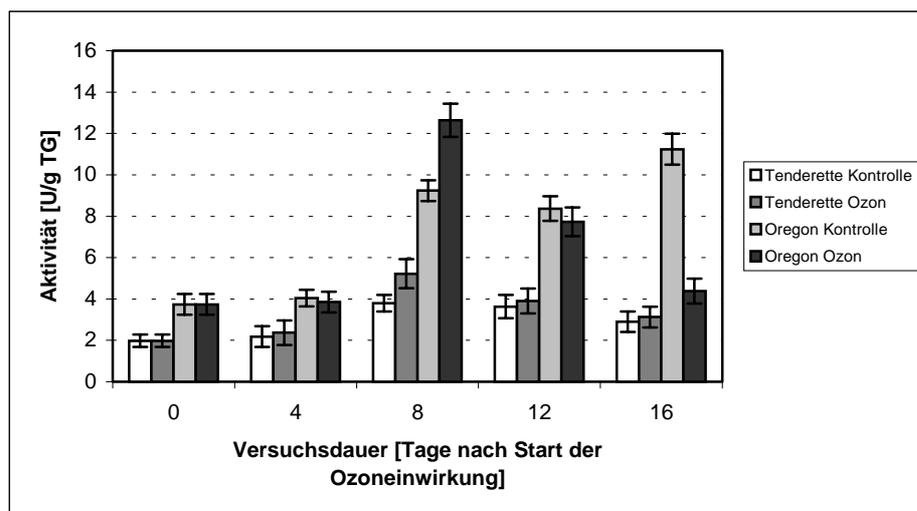


Abb. 26: Änderungen der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 4)

### 3.2.3 Proteine

Die Konzentrationen löslicher Proteine in Zellextrakten zeigte nur leichte Schwankungen im Versuchszeitraum. Bei beiden Varietäten war unter Kontrollbedingungen ein tendenzieller Abfall nach 14 Tagen, gefolgt von einem leichten Anstieg, zu erkennen.

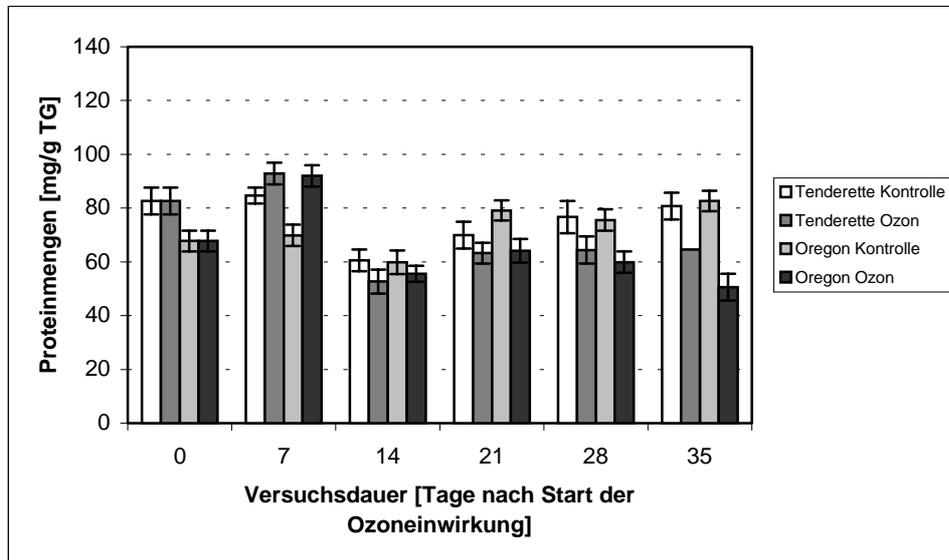


Abb. 27: Änderungen der Fraktion der löslichen Proteine beider Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 3)

Beide Varietäten wiesen annähernd gleiche Proteinmengen auf. Ozoneinfluss resultierte zu Beginn des Versuches (7 Tage) in einer tendenziellen Erhöhung der Fraktion der löslichen Proteine bei beiden Varietäten. Dem folgte eine Abnahme der Proteinkonzentration unter die Werte der Kontrollpflanzen. Diese Differenz zu den Kontrollen war zu Beginn nur minimal und erreichte bei 'Tenderette' Werte um 25 % und bei 'Oregon' 40 % zu Ende des Versuchszeitraums (Abb. 27).

### 3.2.4 Chlorophylle/Karotinoide

#### a) Chlorophylle

Der Gesamtchlorophyllgehalt nahm unter Kontrollbedingungen bei beiden Varietäten im Verlauf des Versuches aufgrund der Alterung der Pflanzen kontinuierlich ab. *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' wies hierbei tendenziell höhere Chlorophyllkonzentrationen auf. Ozonbehandlung führte bei beiden Varietäten im Vergleich zu den Kontrollpflanzen zu einem Chlorophyllverlust. Diese Verminderung war bei *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' zu Beginn des Versuchs größer als bei *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette'. Zum Ende der Versuchsreihe zeigte sich dieser Verlust bei 'Tenderette' stärker ausgeprägt (Abb. 28).

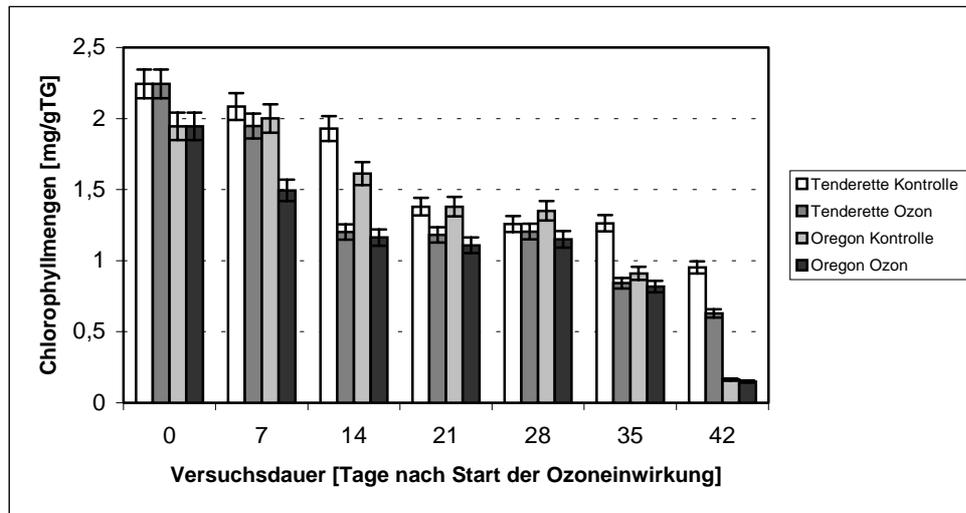


Abb. 28: Änderungen der Gesamtchlorophyllmengen beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 2)

Der Chlorophyllverlust basierte bei beiden Varietäten auf geringeren Chlorophyll a-Gehalten. Ausnahmen hierbei waren: *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' nach 7 bzw. 28 Tagen unter Ozoneinfluss und *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' nach 35 bzw. 42 Tagen unter Kontrollbedingungen. Hier war das Verhältnis Chlorophyll a/Gesamtchlorophyll deutlich verschoben. Das Verhältnis lag durchschnittlich bei 0,8 und zu Ende der Versuchsreihe bei 0,7 (Abb. 29).

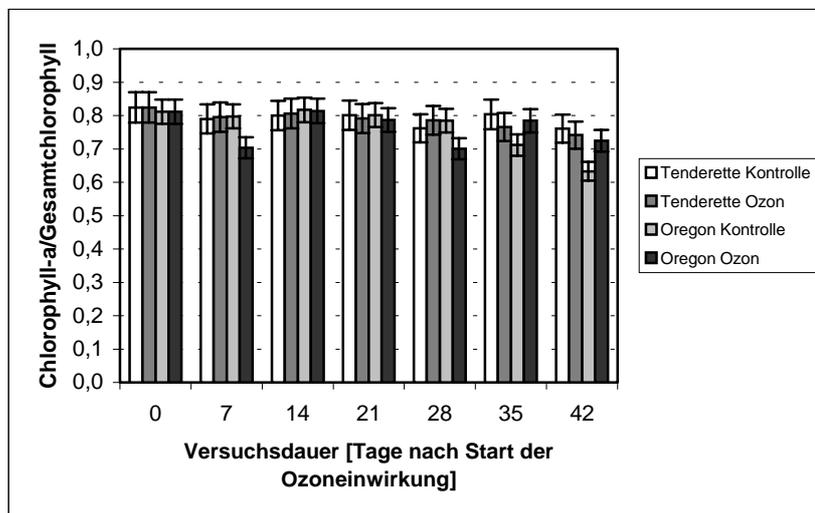


Abb. 29: Änderungen der Verhältnisse Chlorophyll-a/Gesamtchlorophyll beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 2)

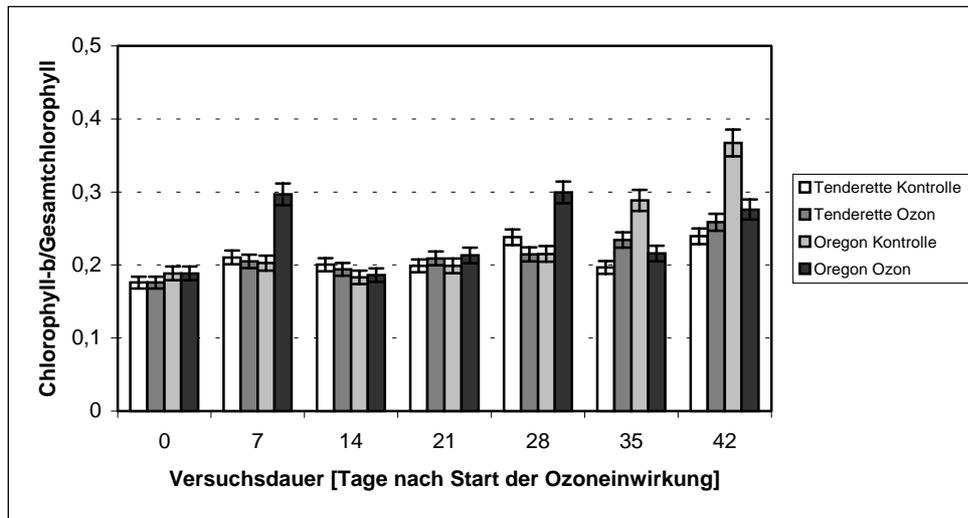


Abb. 30: Änderungen der Verhältnisse Chlorophyll-b/Gesamtchlorophyll beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 2)

Das Verhältnis Chlorophyll-b/Gesamtchlorophyll lag zwischen 0,2 und 0,3. Stärkere Abweichungen dieses Verhältnisses waren - entsprechend den bereits für das Verhältnis Chlorophyll-a/Gesamtchlorophyll beschriebenen - bei der 'Oregon' bei 7 und 28 Tagen und bei der 'Tenderette' nach 35 und 42 Tagen zu verzeichnen (Abb. 30). Die ermittelten Werte entsprachen dem theoretisch erwarteten Chlorophyll-a/Chlorophyll-b-Verhältnis von 3:1.

a) Karotin

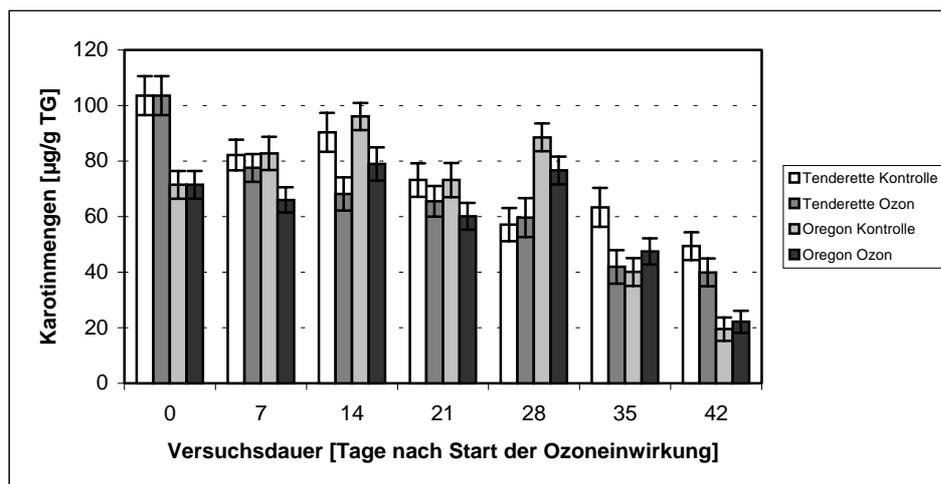


Abb. 31: Änderungen der Karotinmengen beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 2)

Unter Kontrollbedingungen waren deutliche Schwankungen der Karotinmengen bei beiden Varietäten zu erkennen. Unter Ozon zeigte sich bei *Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ ein kontinuierlicher Abfall der Karotinmengen auf die Hälfte der Ausgangswerte. Die Karotinmengen lagen dabei immer unter denen der Kontrollpflanzen (die Differenz variierten). *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’ zeigte auch unter Ozoneinfluss Schwankungen der Konzentrationsänderungen. Der Vergleich mit den Kontrollpflanzen zeigte für die ozonbehandelten Pflanzen bis 28 Tage geringere ( $\approx 15\%$ ) Karotinmengen. Zu Ende der Versuchsreihe (35-42 Tage) wiesen die behandelten Pflanzen höhere Karotinmengen auf (Abb.31).

### 3.2.5 Gesamt-Antioxidantienkapazitäten

#### a) DPPH-assay (Probenaufarbeitung in Methanol)

Die Gesamt-Antioxidantienkapazität, ermittelt aus einem methanolischen Blattextrakt, zeigte bereits bei dem Vergleich der Kontrollpflanzen varietäten-bedingte Unterschiede. Für *Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ zeigten sich zu Beginn relativ konstante Werte um  $130\ \mu\text{mol/g TG}$ . Dem folgte ein Anstieg um  $30\%$  und im Anschluss ein Abfall um  $40\%$  auf Werte unterhalb der Ausgangskonzentrationen. Die Konzentrationen von *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’ unterlagen noch stärkeren Schwankungen. Sie lagen zu Beginn der Versuchsreihe unter denen der Varietät ‘Tenderette’, glichen sich an und als einmaliges Ereignis (bei 35 Tagen) überstiegen sie die Werte geringfügig.

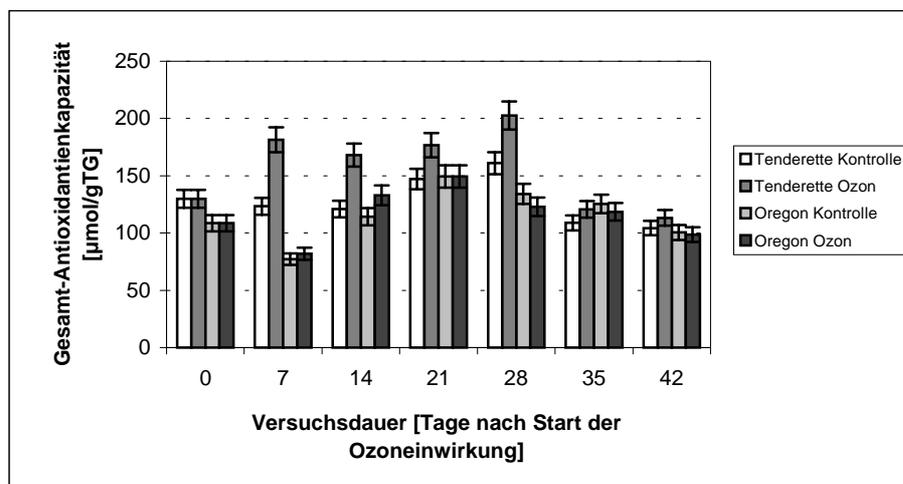


Abb. 32: Änderungen der Gesamt-Antioxidantienkapazitäten beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (DPPH-assay;  $n = 3$ )

Ozoneinfluss resultierte bei *Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ in durchgehend höheren Gesamt-Antioxidantienkapazitäten, maximale Werte um  $200\ \mu\text{mol/g TG}$  wurden erreicht. *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’ zeigte unter Ozoneinfluss ein heterogenes Verhalten. Einem geringfügigen Anstieg zu Beginn folgte der Abfall der Kapazitäten-

Werte zu Ende der Versuchsreihe im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Abb. 32). Die Differenzen unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen waren bei *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' zu Beginn der Versuchsreihe deutlich größer ( $\approx 40\%$ ) als zu Ende der Versuchsreihe ( $\approx 10\%$ ). *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' zeigte zu Beginn eine maximale Steigerung von ca. 20 % (14 Tage). Im weiteren Versuchsverlauf waren keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und begasten Pflanzen zu erkennen (21 Tage) und im Folgenden lagen die Werte 5–10 % unter denen der Kontrollpflanzen (Abb. 33).

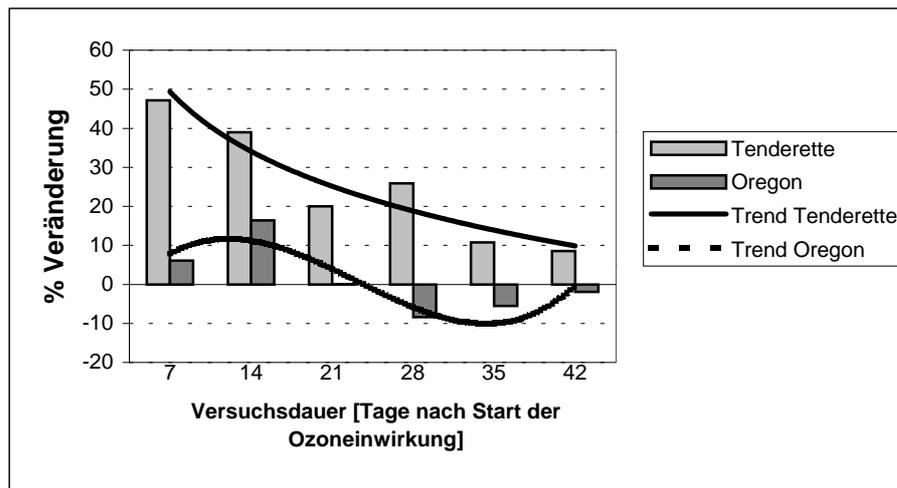


Abb. 33: Prozentuale Veränderungen der Gesamt-Antioxidantienkapazitäten beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss bezogen auf die Kontrollpflanzen; Trendlinienberechnungen mittels Excel

b) NBT-assay (Probenaufarbeitung in Puffer)

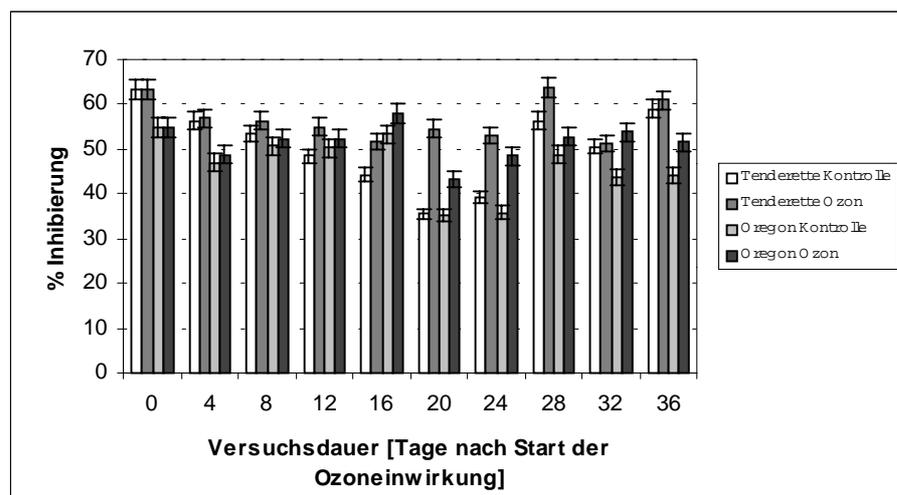


Abb. 34: Änderungen der Gesamt-Antioxidantienkapazitäten (ausgedrückt über die Inhibierungsfähigkeit der Superoxidradikal-Entstehung; NBT-assay) beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 3)

*Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ und *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’ zeigten unter Kontrollbedingungen die Fähigkeit zur Inhibierung der Superoxidradikal-Entstehung. Zu Beginn der Versuchsreihe konnte ‘Tenderette’ die Entstehungsrate zu 60 % inhibieren. Die Rate sank im Verlauf des Versuches auf Werte um 40 % und stieg im Anschluss auf die Ausgangswerte. ‘Oregon’ lag im Vergleich dazu zu Beginn (bis 8 Tage) unter den Werten von ‘Tenderette’ ( $\approx 10$  %). Im weiteren Verlauf zeigten beide Varietäten ähnliche Werte (8-12 Tage) mit kurzfristig höheren Inhibierungsraten bei 16 Tagen bei ‘Oregon’. Zu Ende der Versuchsreihe lagen die Werte wieder unter denen ( $\approx 10$ -15 %) von ‘Tenderette’ (Abb. 34).

Ozon führte bei beiden Varietäten zu erhöhten Inhibierungsraten im Vergleich zu den Kontrollen. *Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ zeigte hierbei zu Beginn einen kontinuierlichen Anstieg (bis 20 % Zunahme im Vergleich zu den Kontrollen). Nach 20 Tagen unter Ozoneinfluss war eine maximale Zunahme von über 50 % zu verzeichnen, danach folgte ein kontinuierlicher Abfall und somit Ausgleich an die Werte der Kontrollpflanzen. Dieser Verlauf war bei *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’ annähernd identisch. Hier war jedoch eine zeitliche Verschiebung im Vergleich zur Varietät ‘Tenderette’ zu verzeichnen. Der maximale Anstieg wurde zeitversetzt (um 4 Tage) zu *Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ erreicht und belief sich auf ca. 35 %. Auch hier folgte ein Abfall der Inhibierungsrate zu Ende des Versuchsverlaufs (Abb. 35).

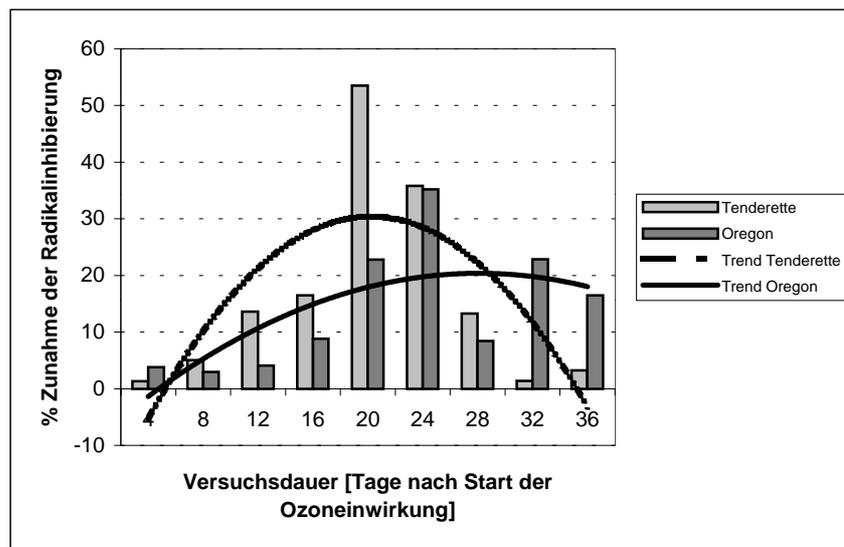


Abb. 35: Prozentuale Zunahme der Inhibierungsfähigkeit unter Ozoneinfluss bezogen auf die Kontrollpflanzen; *Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ durchläuft ein ausgeprägtes Maximum, *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’ weist einen flacheren Verlauf auf, die max. Amplitude ist geringer als bei ‘Tenderette’; Trendlinienberechnung mittels Excel

### 3.3 Chloroplasten- und Protoplastenisolierungen

#### 3.3.1 Chloroplasten

##### a) Ascorbat

Zur Ascorbat-Bestimmung wurde eine Probe der Chloroplastensuspension im Verhältnis 2:1 mit 0,1 N HCl versetzt.

Die Ascorbatmengen in den Chloroplasten zeigte eine Abnahme über die Zeit. Die Menge verringerte sich von 90  $\mu\text{mol}/\text{Chloroplasten pro 1 g TG}$  (zu Beginn) auf 70  $\mu\text{mol}/\text{Chloroplasten pro 1 g TG}$  (zu Ende). Der Verlauf entsprach dem für die Ascorbatmenge von Gesamtblattextrakten beschriebenen. Bei den Kontrollpflanzen war kein Varietätenunterschied zu erkennen. Auch die Ozonbehandlung zeigte keinen Einfluss auf die Ascorbatkonzentration in den Chloroplasten beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten (Abb. 36).

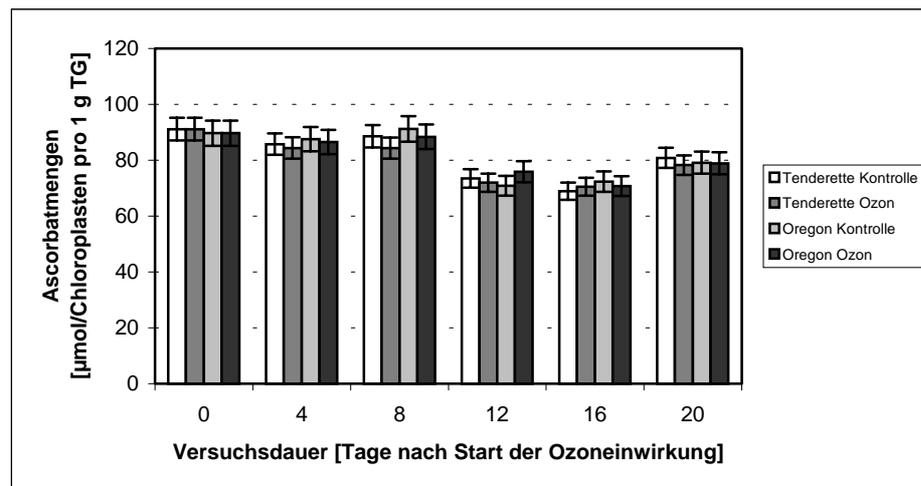


Abb. 36: Änderungen der Ascorbatmengen in Chloroplasten beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozonfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen

Die Fraktionen des reduzierten Ascorbats lagen in den Chloroplasten bei 95 %. Bei den Kontrollpflanzen waren keine Varietätenunterschiede der Ascorbat<sub>red</sub>-Fraktion zwischen 'Tenderette' und 'Oregon' zu erkennen. Auch eine Behandlung mit Ozon zeigte keine Wirkung auf die Ascorbat<sub>red</sub>-Fraktionen der beiden *Phaseolus vulgaris* Varietäten (Abb. 37). Auch hier lagen um 95 % des Ascorbats in der reduzierten Form vor.

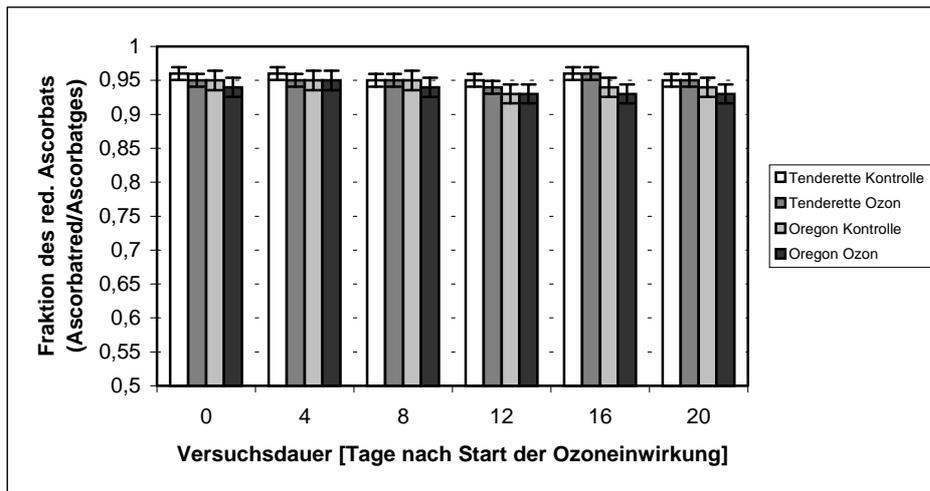


Abb. 37: Änderungen der Ascorbat<sub>red</sub>-Fraktion in Chloroplasten beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen

b) Ascorbatperoxidase

Die Ascorbatperoxidase-Aktivität in den Chloroplasten zeigte Varietäten-bedingte Unterschiede. Die sensitivere Varietät 'Oregon' wies unter Kontrollbedingungen durchgehend höhere Ascorbatperoxidase-Aktivitäten auf (ca. 25 %), im Vergleich zu 'Tenderette'. Der Verlauf der Aktivitätsänderungen war bei beiden Varietäten identisch. Zu Beginn des Versuches war ein Anstieg der Aktivität zu erkennen, nach maximalen Werten am 8. Tag folgte ein erneuter Abfall. Dieser zeitliche Verlauf entsprach dem der Ascorbatperoxidase-Aktivität der Gesamtblattextrakte. Ozon hatte keinen Einfluss auf die Ascorbatperoxidase-Aktivität in den Chloroplasten beider Varietäten (Abb. 38).

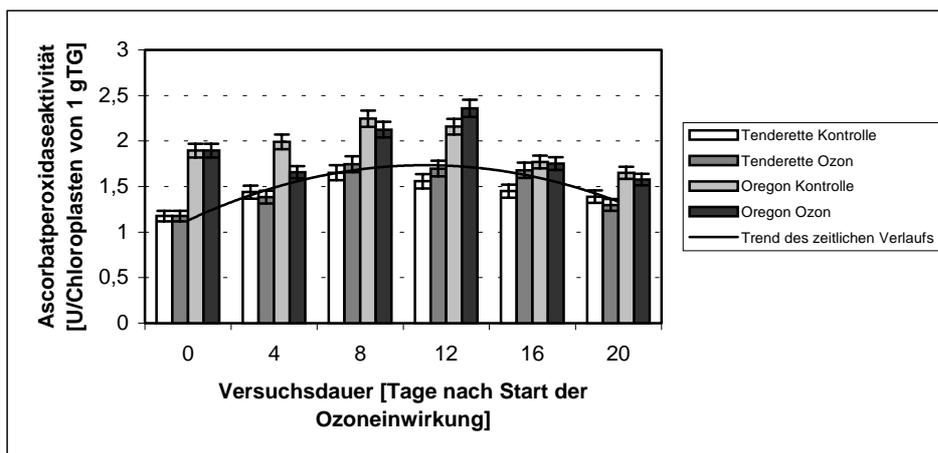


Abb. 38: Änderungen der Ascorbatperoxidase-Aktivität in Chloroplasten beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Trendlinienberechnung durch Excel)

### 3.3.2 Protoplasten

Die vorhandenen Protoplasten wurden mikroskopisch auf Unversehrtheit untersucht, ausgezählt und standen danach zur Messung zur Verfügung. Kräftiges „Vortexen“ der Protoplastensuspension und kurzes Zentrifugieren bereiteten die Messlösung vor.

#### a) Ascorbat

Die Gesamtascorbatmenge war in beiden Varietäten vergleichbar groß (max. 5 % Abweichung). Hinsichtlich der Ascorbat<sub>red</sub>-Fraktion fanden sich keine deutlichen Unterschiede (Abb. 39).

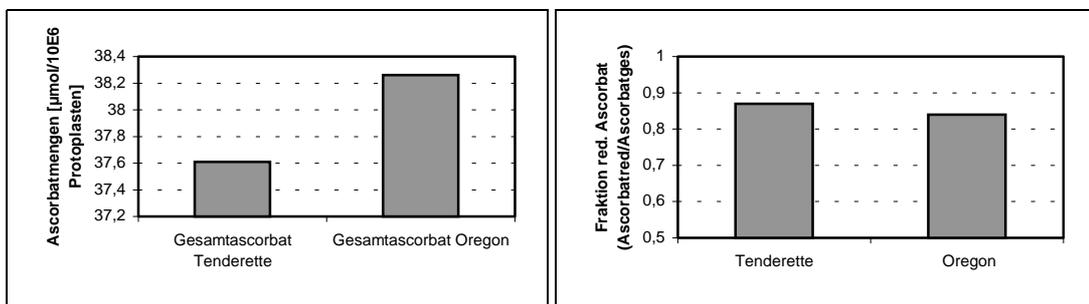


Abb. 39: Ascorbatmengen in den Protoplasten von *Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ und *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’ (links) und Fraktion des reduzierten Ascorbats beider Varietäten im Vergleich

#### b) Ascorbatperoxidase

Die Messung der Ascorbatperoxidaseaktivität zeigte wie schon bei den Gesamtblattanalysen für *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’ um ca. 20 % höhere Aktivitätswerte in den Protoplasten im Vergleich zu *Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ (Abb. 40).

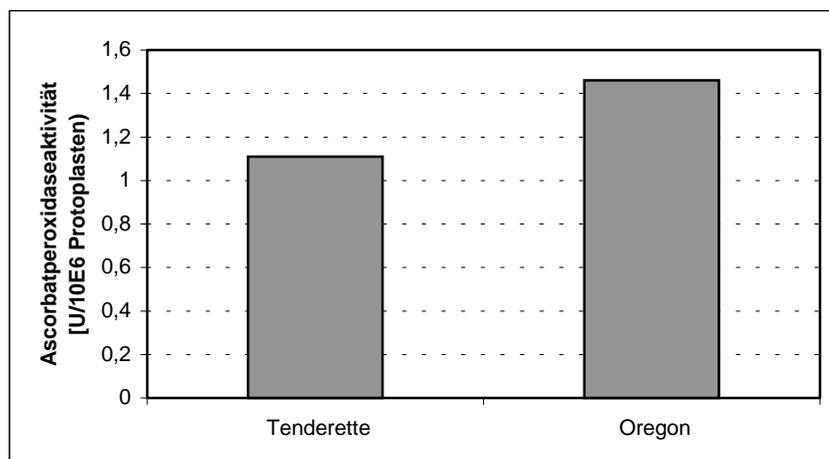


Abb. 40: Ascorbatperoxidaseaktivität in den Protoplasten von *Phaseolus vulgaris* ‘Tenderette’ und *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’

### 3.4 Rasterelektronenmikroskopie

Ozon resultierte in sichtbaren Ozonschäden auf den Blättern von *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' nach 14 Tagen Ozon und nach 28 Tagen bei *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' (siehe auch Kapitel 3.1). Diese im fortgeschrittenen Stadium blattflächen-deckenden nekrotischen Bereiche waren mit bloßem Auge zu erkennen. Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen sollten Aufschlüsse liefern, ob und wie sich diese „sichtbaren Schäden“ auf mikroskopischer Ebene darstellen. Es sollte ermittelt werden, inwieweit sich die auf physiologischer Ebene erfassbaren Schäden auch auf struktureller Ebene ausweiten können, ob und wie z. B. Membranschäden verursacht durch Ozon den strukturellen Zusammenhalt der Zelle und im weiteren den des Zellverbandes bestimmen.

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen erlaubten gleichzeitig einen „Blattober- und Blattunterseiten“-Vergleich der *Phaseolus vulgaris* Pflanzen. Dieser zeigte zum einen die unterschiedlichen Stomataverteilungen und zum anderen die Verteilung von Haaren und Drüsen auf den Oberflächen. Varietätenunterschiede waren hierbei jedoch keine zu erkennen. Der Seitenvergleich ergab eine Stomataverteilung von 1:4 („Blattoberseite/ Blattunterseite“). Deutlich zu erkennen war das vermehrte Auftreten von Haaren und Drüsen auf den „Unterseiten“ (Abb. 41 und 42).

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen brachten jedoch ein in dieser Art nicht erwartetes Ergebnis. Wie der Vergleich der Abbildungen 41/42 mit 43/44 zeigt, waren rasterelektronenmikroskopisch keine Unterschiede zwischen „gesunden“ Blättern von Kontrollpflanzen (Abb. 41 und 42) und „geschädigten“ Blättern der ozonbegasteten Pflanzen (Abb. 43 und 44) zu erkennen.

Vielmehr konnte die Aufrechterhaltung von mikroskopischen Strukturen als Ergebnis dieser Bilder dokumentiert werden. Die Ursache hierfür war zu einem großen Teil in der den Untersuchungen zugrundeliegenden Aufarbeitungs- und Fixierungsmethode zu suchen. Der phänotypisch erkennbare Unterschied der farblichen Veränderung des nekrotischen Bereiches gegenüber „gesundem“ Blattgewebe spielte aufgrund der Pigmentauflösung im Rahmen der Probenaufbereitung offensichtlich keine Rolle mehr. Darüber hinaus scheint die Aufbereitungsprozedur eventuell weitere sichtbare Veränderungen überdeckt zu haben.

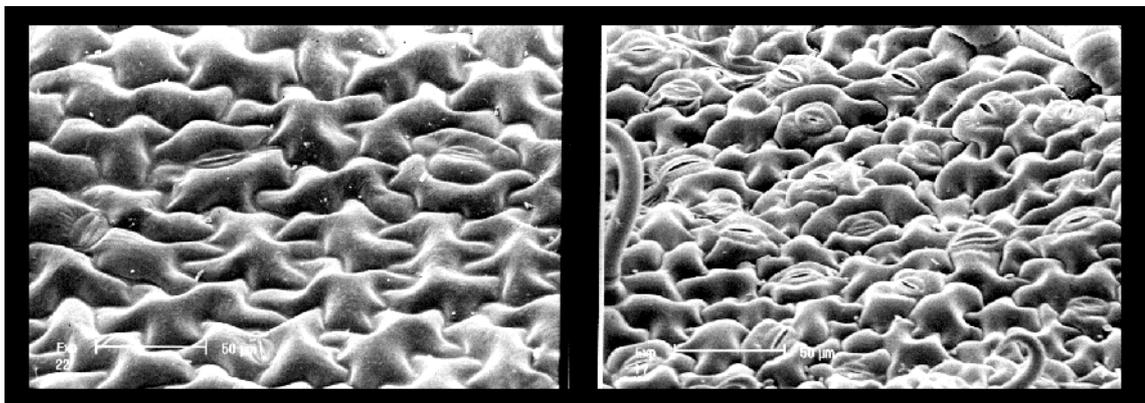


Abb. 41: *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette': Kontrollpflanzen; Blattoberseite (links) und Blattunterseite (rechts); 500 x

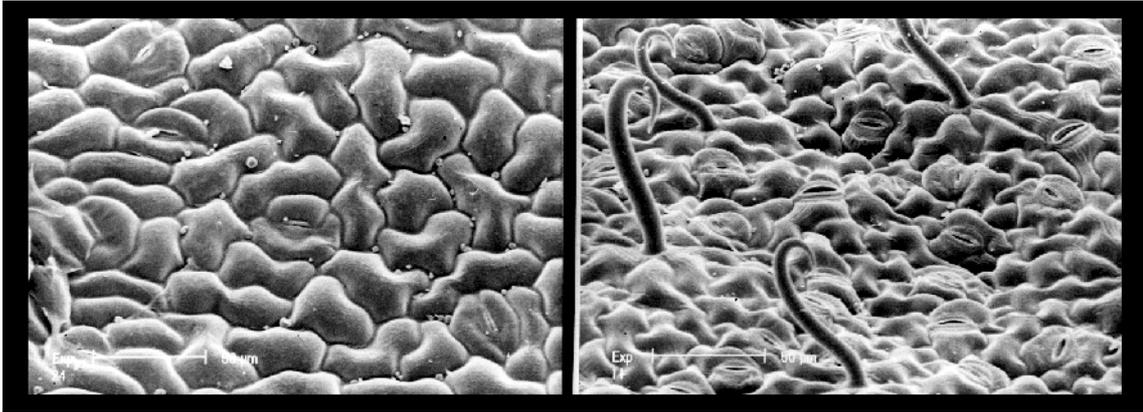


Abb. 42: *Phaseolus vulgaris* 'Oregon': Kontrollpflanzen; Blattoberseite (links) und Blattunterseite (rechts); 500 x

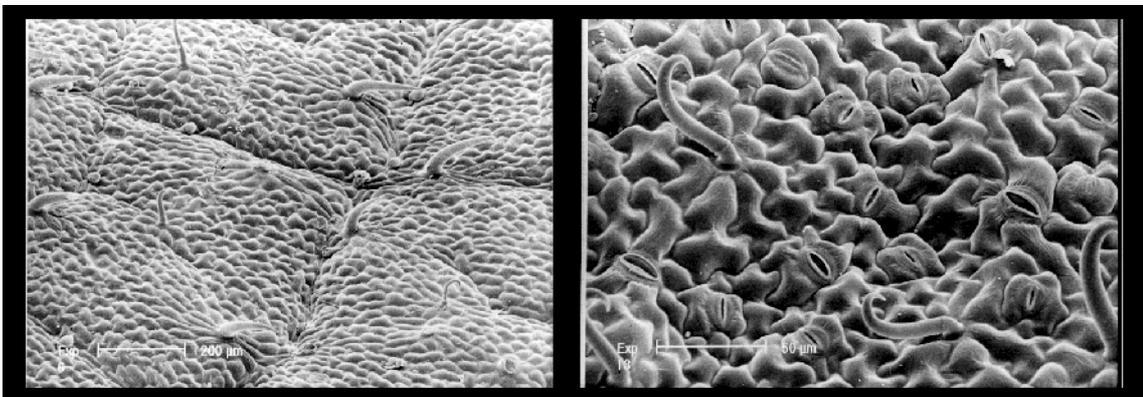


Abb. 43: *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette': mit Ozon behandelte Pflanzen; Blattoberseite (links; 100 x) und Blattunterseite (rechts; 500 x)

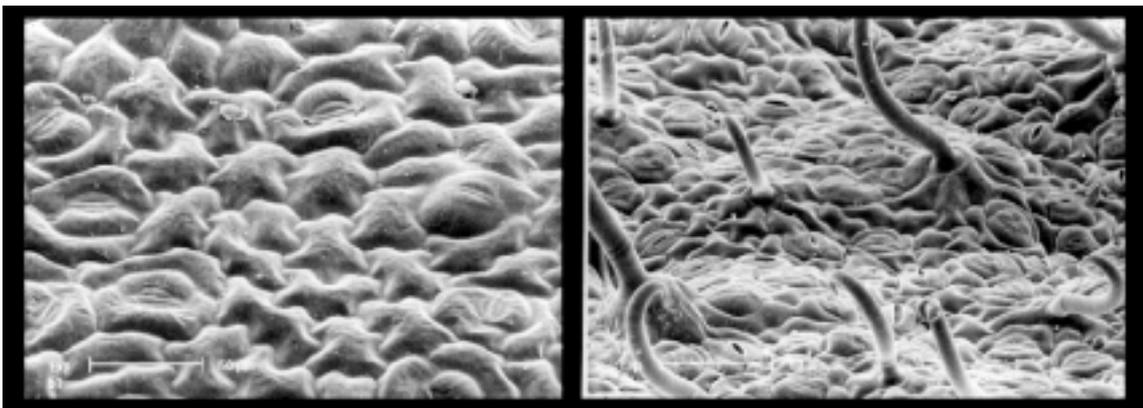


Abb. 44: *Phaseolus vulgaris* 'Oregon': mit Ozon behandelte Pflanzen; Blattoberseite (links) und Blattunterseite (rechts)

## 3.5 Apoplastenfluidgewinnung und Analysen

Die von Husted und Schjoerring (1995) entwickelte Methode zur Gewinnung des Apoplastenfluids konnte mit einigen Modifikationen auf die Bohnen übertragen werden. Eine Voraussetzung zur optimalen Infiltration war jedoch in allen Fällen die Ernte der Pflanzen im Laufe des Vormittags, um die Zeit optimaler Spaltenöffnung auszunutzen. Eine Belichtung der Pflanzen brachte eine nochmalige Steigerung der Infiltrationsrate, wobei die Belichtungsdauer mit den im Freiland gegebenen Bedingungen abgestimmt werden musste (Vermeidung von Lichtstress). Eine optimale Wasserversorgung war unbedingt notwendig. Schlechte Witterungsbedingungen, wie starke Bewölkung mit Regen, machte eine Verlängerung der Belichtungszeiten notwendig.

Auch für die Bohnen wurde isotonische Sorbitollösung für die Infiltration verwendet. Versuche mit unterschiedlichen Substanzen (100 mM KCl nach Luwe, Heber 1995; Luwe 1996; 66 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ -Puffer nach Ranieri et al. 1996) resultierten in einer schlechteren Infiltrationsrate und brachten auch für die anschließenden Untersuchungen keine Verbesserungen. Die optimale Temperatur der Lösung liegt um 10 °C.

Das Anlegen und Aufheben des Vakuums sollte langsam erfolgen. Die Wachstumsbedingungen spielten bei der Wahl der Vakuumstärke ebenso eine Rolle wie die ausgesuchte Pflanzenart. Für Bohnen, die im Freiland kultiviert wurden, konnte ein Vakuum von -10 kPa angelegt werden. Im Gewächshaus kultivierte Pflanzen mussten bei weniger starkem Vakuum infiltriert werden. Wurden die Stanzstücke zwischen den einzelnen Vakuumbehandlungen belichtet, mussten die Schalen auf Eis gestellt werden, um eine Erwärmung der Sorbitollösung zu vermeiden. Diese resultierte zum einen in erhöhten cytoplasmatischen Verunreinigungen und zum anderen in verminderten Enzymaktivitäten und Proteingehalten.

Für das Zentrifugieren mussten ebenfalls die Wachstumsbedingungen beachtet werden. Im vorliegenden Fall wurde bei max. 2000 g zentrifugiert. Höhere Zentrifugationsstufen resultierten in verstärkten Kontaminationen durch cytoplasmatische Komponenten zerstörter Zellen. Ziel der Infiltration war es die Verunreinigungen < 2,5 % zu halten (ermittelt als Malatdehydrogenase-Aktivität), was mit den oben genannten Bedingungen erreicht wurde.

Die Ausbeute der Infiltrationsmethode lag für *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' bei 160 µl Apoplastenfluid pro Gramm Frischgewicht und für *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' bei 150 µl Apoplastenfluid pro Gramm Frischgewicht.

### 3.5.1 Metaboliten

#### a) Ascorbat

Der Vergleich der Kontrollpflanzen aus zwei Vegetationsperioden (1998 und 1999) zeigte hinsichtlich der Änderungen der Gesamtascorbatmengen im Apoplasten deutliche Unterschiede. Die Pflanzen aus der Vegetationsperiode 1998 wiesen einen Anstieg der Ascorbatmengen im Laufe des Versuches auf. Dieser Anstieg erfolgte nicht kontinuierlich. Ausgehend von einem niedrigen Plateau wurde nach einer Anstiegsphase im

Bereich von 14-21 Tagen ein neues, deutlich höheres Plateau erreicht (zu sehen am Verlauf der Trendlinie bei 'Tenderette' Kontrolle). Dabei waren Unterschiede zwischen den beiden Varietäten zu erkennen, die jedoch keine einheitlichen Tendenzen zeigten (Abb. 45).

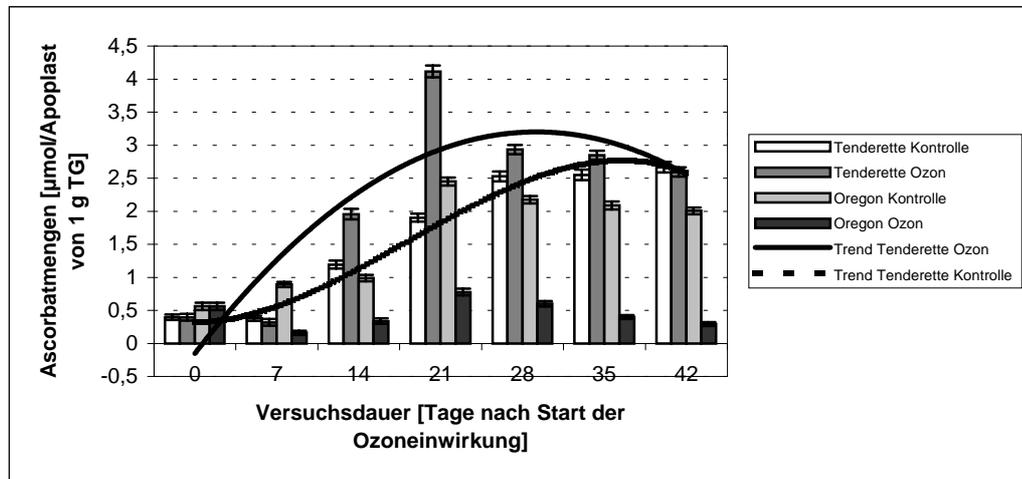


Abb. 45: Änderungen der Gesamtascorbatmengen im Apoplastenfluid beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Pflanzen aus der Vegetationsperiode 1998; n = 2); Trendlinienberechnungen mittels Excel

Bei den Pflanzen aus der Vegetationsperiode 1999 (Abb. 46) waren die Ausgangswerte geringfügig höher, es erfolgte ein Anstieg der Ascorbatmengen bei beiden Varietäten, dem im späteren Versuchsverlauf ein Abfall folgte. Insgesamt war ein nivelliertes Maximum zu erkennen.

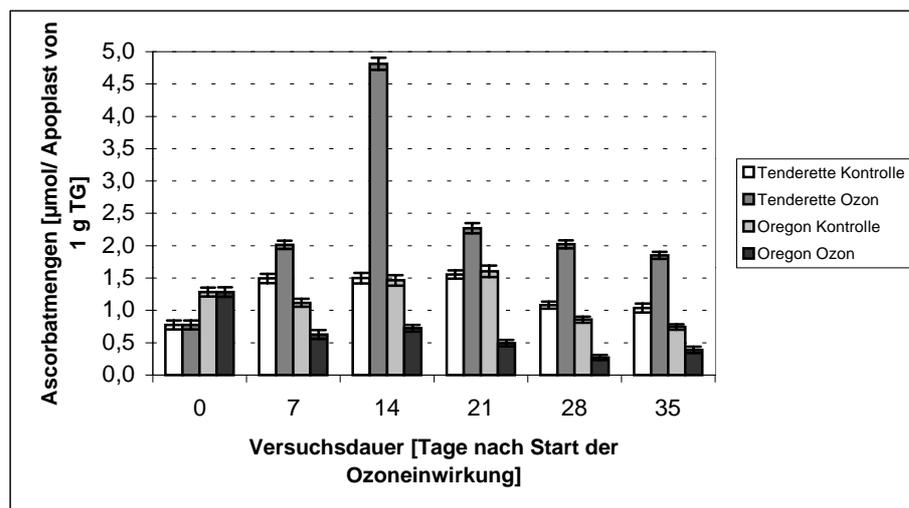


Abb. 46: Änderungen der Gesamtascorbatmengen im Apoplastenfluid beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Pflanzen aus der Vegetationsperiode 1999; n = 2)

Da die Aufarbeitung und Messung der Pflanzen ohne Lagerungszeiten erfolgte und somit gleiche Voraussetzungen vorlagen, müssen diese Unterschiede in den unterschiedlichen Umweltbedingungen der beiden Vegetationsperioden zu suchen sein. Ozoneinfluss resultierte in einem gegensätzlichen Verhalten beider Varietäten. *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' wies eine deutliche Zunahme der Gesamtascorbatmenge im Apoplasten auf. Diese konnte im Maximum um 130 % (1998) bzw. sogar 200 % (1999) betragen. In beiden Jahren lagen die Konzentrationen unter Ozoneinfluss durchgehend über denen der Kontrollpflanzen. Während das Durchlaufen eines Maximums in der Darstellung für 1999 deutlicher hervortrat, wurde es in der Darstellung für 1998 durch die Ergänzung einer Trendlinie erkennbarer. *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' zeigte ein entgegengesetztes Bild. Ozoneinfluss bewirkte eine deutliche Verminderung der Gesamtascorbatmengen im Apoplasten. Die Ascorbatmenge war unter Ozoneinfluss zwischen 50 % und max. 80 % niedriger im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Der Einfluss der übrigen Umweltbedingungen, der einen Unterschied im zeitlichen Verlauf der Gesamtascorbatmengen bei den Kontrollpflanzen bewirkte, wurde durch eine Ozonbehandlung offensichtlich überdeckt. Deutlich wurde bei beiden Vegetationsperioden, dass Ozon bei der toleranteren Varietät 'Tenderette' einen Anstieg der Gesamtascorbatmenge im Apoplasten zur Folge hatte. Diesem stand bei der sensitiven 'Oregon' ein deutlicher Verlust von Ascorbat im Apoplasten unter Ozon (im Vergleich zu den Kontrollpflanzen) gegenüber (Abb. 47).

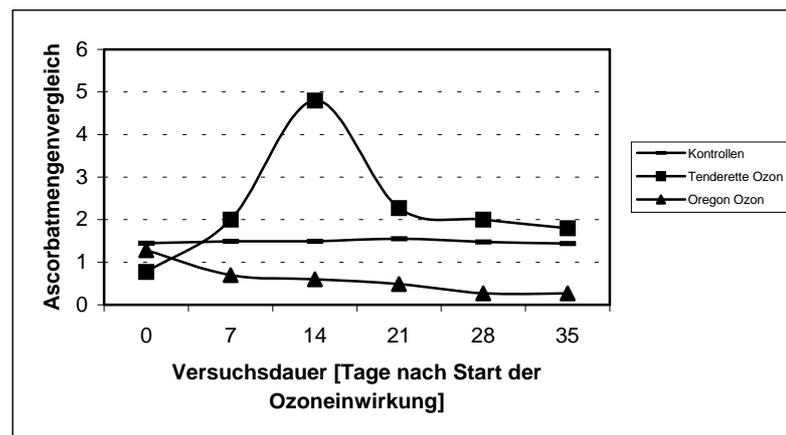


Abb. 47: Vergleich der Veränderungen der Ascorbatmengen von *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' und *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' gegenüber den Kontrollen

Die Fraktion des reduzierten Ascorbats lag unter den gegebenen Bedingungen bei den Kontrollpflanzen bei 0,55. Dieser Wert sollte jedoch mit einem kleinen Fragezeichen versehen werden, da die Abweichungen der einzelnen Werte, die im Bereich von 15 % lagen keine absoluten Aussagen zulassen. Zwischen den beiden Varietäten waren keine Unterschiede zu erkennen (Abb. 48).

Ozoneinfluss resultierte bei beiden Varietäten tendenziell in einer Verminderung der Ascorbat<sub>red</sub>-Fraktion, d.h., die Ozonbehandlung bewirkte einen Anstieg der oxidierten Form des Moleküls im Apoplasten. Aber auch hier mussten aufgrund der Abweichungen der Einzelwerte Abstriche gemacht werden.

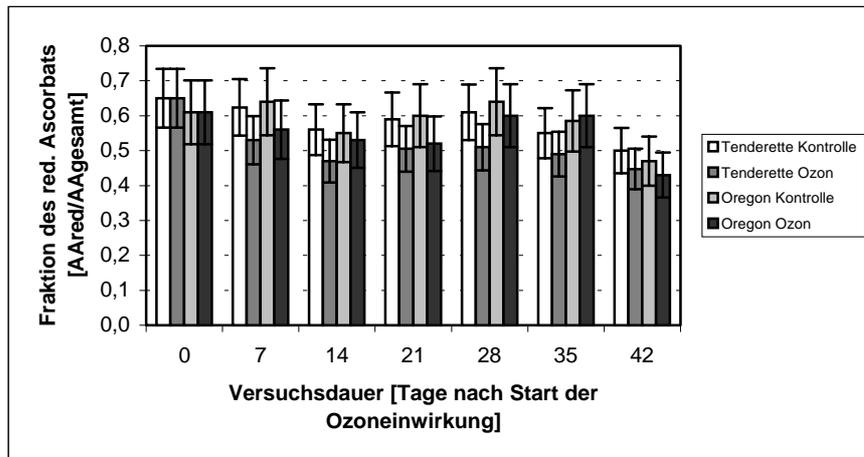


Abb. 48: Änderung der Ascorbat<sub>red</sub>-Fraktionen (Ascorbat<sub>red</sub>/Ascorbat<sub>gesamt</sub>) im Apoplastenfluid beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 4 aus 2 Vegetationsperioden)

## b) Glutathion

Die Kontrollpflanzen von *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' wiesen über die gesamte Versuchsdauer annähernd konstante Gesamtglutathionmengen auf. Bei *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' hingegen waren deutliche Schwankungen der Werte zu erkennen. Ein Vergleich beider Varietäten zeigte, dass 'Oregon' zu Beginn höhere Glutathionmengen im Apoplasten aufwies. Zum Ende der Versuchsreihe kehrten sich diese Verhältnisse um.

Unter Ozoneinfluss zeigte sich erneut die auch für das Ascorbat beobachtete varietätenbedingte Gegensätzlichkeit. Ozon resultierte bei *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' in einem Anstieg der Gesamtglutathionmengen im Apoplasten, im Durchschnitt um 30 % mit einem maximalen Anstieg von 100 % (21 Tage). Bei *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' hingegen war eine deutliche Verminderung der Gesamtglutathionmengen im Apoplasten unter Ozoneinfluss zu verzeichnen, wobei Differenzen von 30 % bis max. 60 % auftreten (Abb. 49).

Die Fraktionen des reduzierten Glutathions (Abb. 50) lagen bei beiden Varietäten unter Kontrollbedingungen um 0,55, d.h., etwas mehr als die Hälfte des Glutathions lag in reduzierter Form vor. Die Varietät 'Oregon' wies dabei tendenziell geringere Werte auf, hier lag auch unter Kontrollbedingungen mehr oxidiertes Glutathion vor. Ozoneinfluss resultierte bei beiden Varietäten in einer Verminderung der Werte für die Glutathionfraktion, d.h., Ozon bewirkte eine Zunahme der oxidierten Formen des Moleküls. Dabei lag bei der sensitiven Varietät 'Oregon' ein deutlich größerer Anteil des (insgesamt verringerten) Glutathions in oxidiertem Form vor.

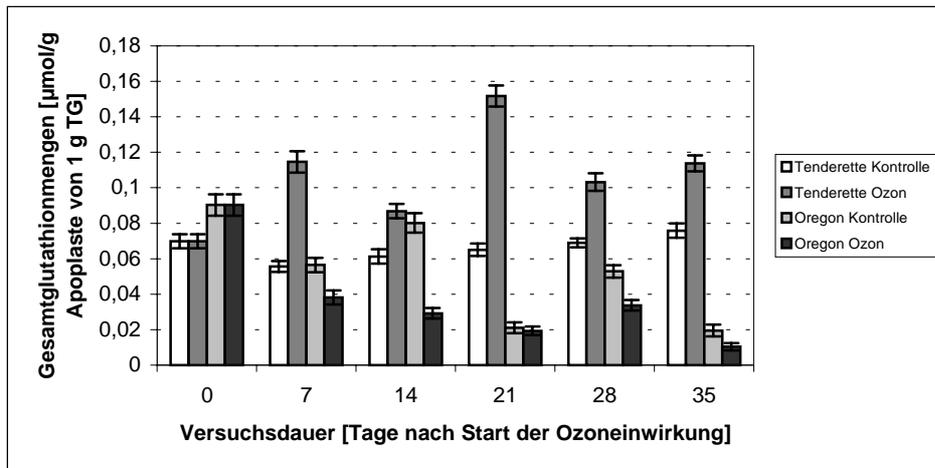


Abb. 49: Änderungen der Gesamtglutathionmengen im Apoplastenfluid beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen ( $n = 2$ )

Auch hier wurden Pflanzen aus zwei Vegetationsperioden analysiert. Im Fall des Glutathions waren jedoch keine derartigen Unterschiede zu erkennen, wie sie bei der Ascorbat-Bestimmung auftraten. Deshalb wurde auf eine differenzierte Darstellung verzichtet.

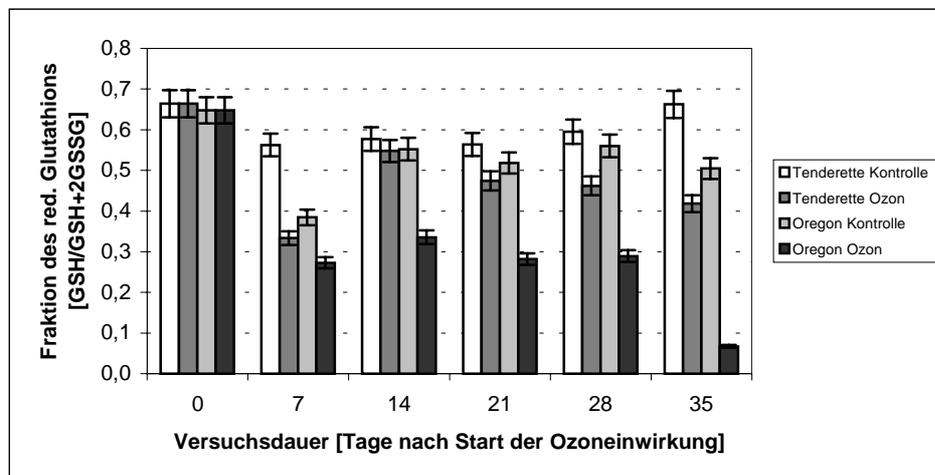


Abb. 50: Änderung der Glutathion<sub>red</sub>-Fraktion ( $\text{Glutathion}_{\text{red}} / \text{Glutathion}_{\text{red}} + 2 \text{ Glutathion}_{\text{ox}}$ ) im Apoplastenfluid beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen ( $n = 2$ )

### 3.5.2 Enzyme

#### a) Ascorbatperoxidase

Die Werte für die Ascorbatperoxidase-Aktivitäten der Kontrollpflanzen zeigten im Versuchszeitraum Schwankungen. Es waren kaum Unterschiede zwischen den Aktivitäten der beiden Varietäten zu erkennen (Abb. 51).

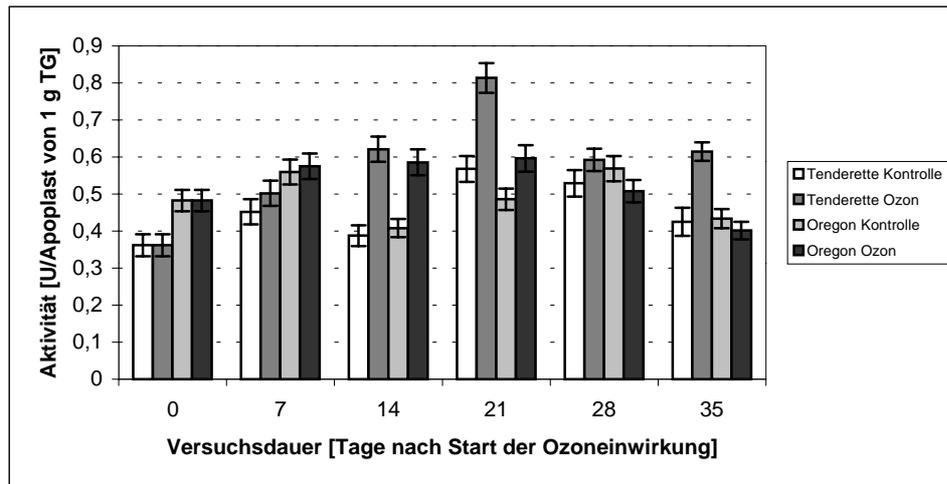


Abb. 51: Änderungen der Ascorbatperoxidase-Aktivitäten im Apoplastenfluid beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n =3)

Ozoneinfluss resultierte bei *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' durchgehend in erhöhten Ascorbatperoxidase-Aktivitäten im Apoplasten. Steigerungen um 50 % im Vergleich zu den Kontrollpflanzen waren hier zu verzeichnen. *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' zeigte zu Beginn ebenfalls erhöhte Ascorbatperoxidase-Aktivitäten mit Steigerungen von 20-50 %. Zu Ende der Versuchsreihe sank die Aktivität in den ozonbehandelten Pflanzen um 15 % im Vergleich zu den Kontrollen. Die Werte durchliefen bei beiden Varietäten ein Maximum, das bei der Varietät 'Tenderette' deutlich ausgeprägt bei 21 Tagen lag und bei 'Oregon' tendenziell einem nivellierten Maximum entsprach (Abb. 51).

#### b) Glutathionreduktase

Auch die Werte der Glutathionreduktase-Aktivität waren Schwankungen unterworfen. Amplitude und Frequenz wiesen bei beiden Varietäten kaum Unterschiede auf. Ozoneinfluss resultierte bei beiden Varietäten in erhöhten GlutathionreduktaseAktivitäten im Apoplasten. Die Steigerungsraten lagen bei ca. 40 %. Beide Varietäten zeigten wechselweise die größeren Absolutwerte (Abb. 52).

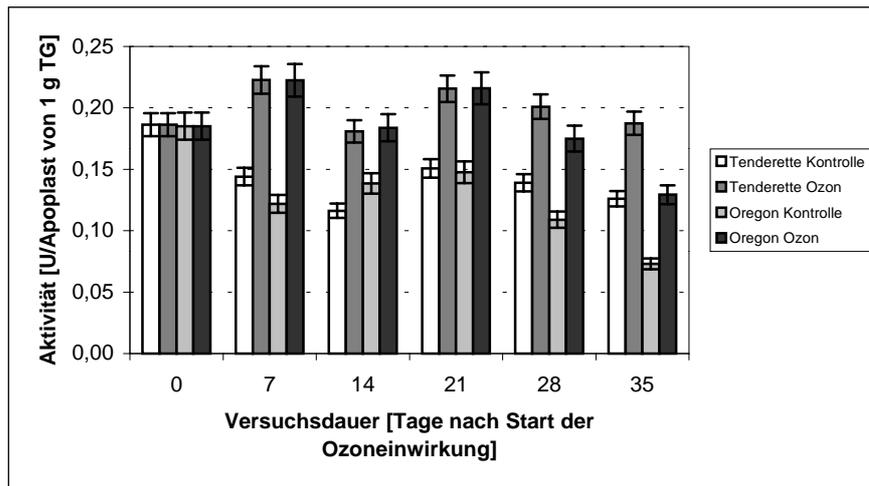


Abb. 52: Änderungen der Glutathionreduktase-Aktivitäten im Apoplastenfluid beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten im Apoplasten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n =3)

c) Dehydroascorbatreduktase

Weder die Kontrollpflanzen noch die ozonbehandelten Pflanzen wiesen Dehydroascorbatreduktase-Aktivitäten im Apoplastenfluid der beiden Varietäten 'Tenderette' und 'Oregon' auf.

d) Unspezifische (Guajacol-abhängige) Peroxidasen

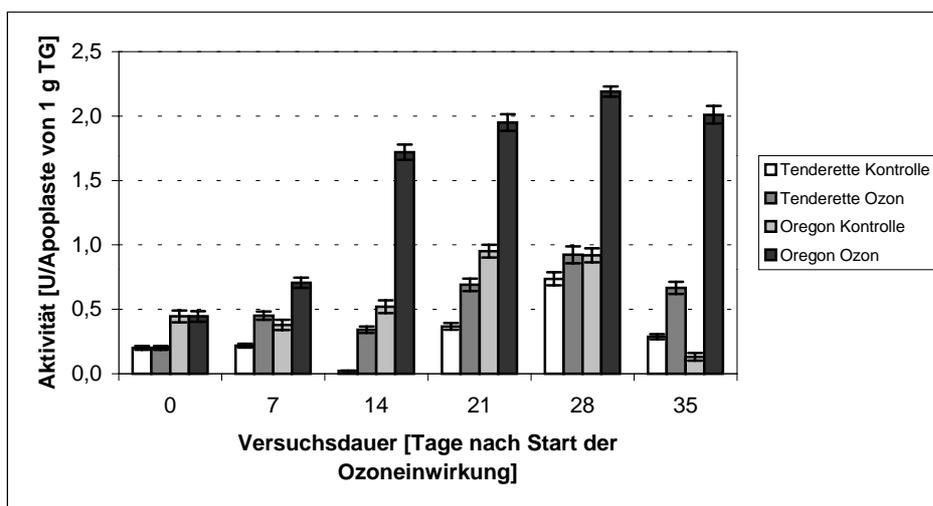


Abb. 53: Änderungen der Peroxidase-Aktivität (Guajacol-abhängige Peroxidase) im Apoplastenfluid beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten im Apoplastenfluid unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (n = 4)

Der Varietätenvergleich zeigte bereits für die Kontrollpflanzen erhebliche Unterschiede in der Peroxidase-Aktivität. Über den gesamten Versuchszeitraum hatte 'Oregon' höhere Peroxidase-Aktivitäten im Vergleich zu 'Tenderette', wobei die Differenzen im Durchschnitt 50 % betragen und im Maximum sogar 300 % erreichten.

Ozoneinfluss resultierte in beiden Varietäten in durchgehend erhöhten Peroxidase-Aktivitäten. Hierbei zeigte sich eine negative Korrelation der Aktivitätswerte mit der beobachteten Toleranz. Die stärkeren Aktivitätsanstiege waren bei der sensitiven Varietät 'Oregon' zu verzeichnen. *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' zeigte Aktivitätststeigerungen von 20-100 %. *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' zeigte die deutlicheren Reaktionen auf die Ozonbehandlung mit Erhöhungen von 100 % bis max. 240 % (Abb. 53).

### 3.5.3 Proteine

Die Fraktion der löslichen Proteine im Apoplasten unterlag bei *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' deutlichen Schwankungen, während sie bei *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' zu Beginn der Versuchsreihe annähernd konstant war und nur zu Ende nach einem Anstieg bei 28 Tagen eine deutliche Abnahme nach 35 Tagen aufwies. Der Varietätenvergleich zeigte für 'Oregon' tendenziell geringere Proteingehalte im Apoplasten im Vergleich 'Tenderette' (Abb. 54).

Ozon resultierte bei beiden Varietäten in einem Anstieg der Menge der löslichen Proteine im Apoplasten. Zu Beginn war dies ein Anstieg um 25 %. In der Mitte der Versuchsreihe waren 40 % mehr Protein zu messen. Dem folgte eine Phase abwechselnder Ab- und Zunahmen. Zu Ende des Versuches zeigte *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' nochmals einen Anstieg um 85 % und *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' sogar um 300 % im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 54).

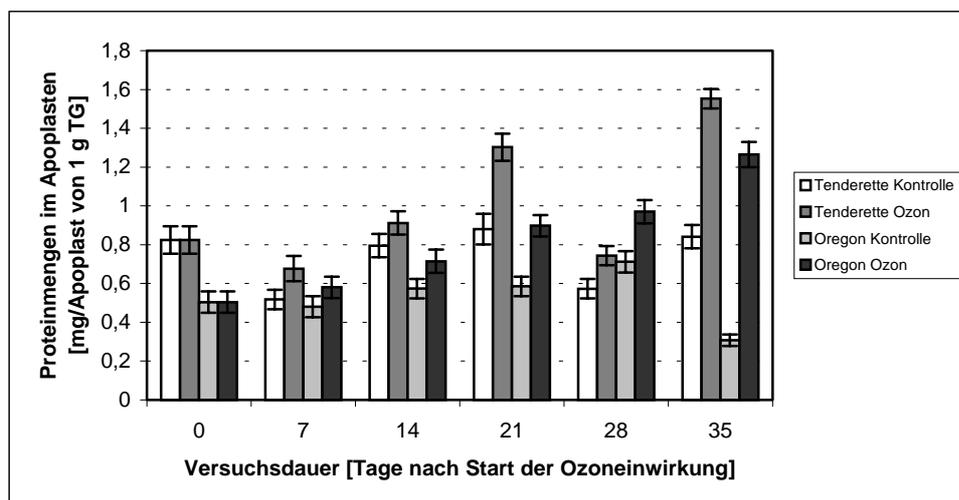


Abb. 54: Änderungen der Fraktion der löslichen Proteine im Apoplastenfluid beider *Phaseolus vulgaris* Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen

### 3.6 Radikale im Apoplasten

Die Akkumulation von Radikalen (ROS) im Apoplasten von mit Ozon behandelten *Phaseolus vulgaris* Pflanzen wurde über die Phenolrot-Oxidation nachgewiesen. Der zellimpermeable Farbstoff wurde über Vakuuminfiltration im Apoplasten gelöst und konnte dort mit evtl. vorliegenden ROS reagieren. Im vorliegenden Fall wurde nur das Vorhandensein der Radikale in den Mittelpunkt gestellt und eine damit gleichzeitig mögliche relative Quantifizierung durchgeführt.

Die bereits bei den Kontrollpflanzen zu erkennende Oxidation des Farbstoffes durch im Apoplasten befindliche ROS war relativ konstant über die gesamte Versuchsdauer zu verzeichnen. Es zeigten sich keine Unterschiede bei den beiden Varietäten.

Die Ozonbehandlung resultierte bei beiden Varietäten in deutlich erhöhten Phenolrot-Oxidationen und somit in einer ROS-Akkumulation im Apoplasten. *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' zeigte diese Zunahme an oxidiertem Farbstoff im Vergleich zu den Kontrollpflanzen ab dem 5. Tag in Größenordnungen von 120 % zu Beginn, über 60 % im weiteren Verlauf und zu Ende noch 30 %. Hier war also eine Verringerung der Akkumulation über die Zeit zu verzeichnen. *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' zeigte die Phenolrot-Oxidation bereits nach 2 Tagen mit deutlichen 100 % im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Die Zunahme des oxidierten Farbstoffes und somit der ROS erfuhr mit über 300 % mehr Farbstoff im Vergleich zu den Kontrollen bei 5 Tagen ein Maximum. Die Werte blieben bei *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' auch im weiteren Verlauf mit 100 % deutlich höher und stiegen sogar zu Ende der Versuchsreihe nochmals auf 160 % an (Abb. 55).

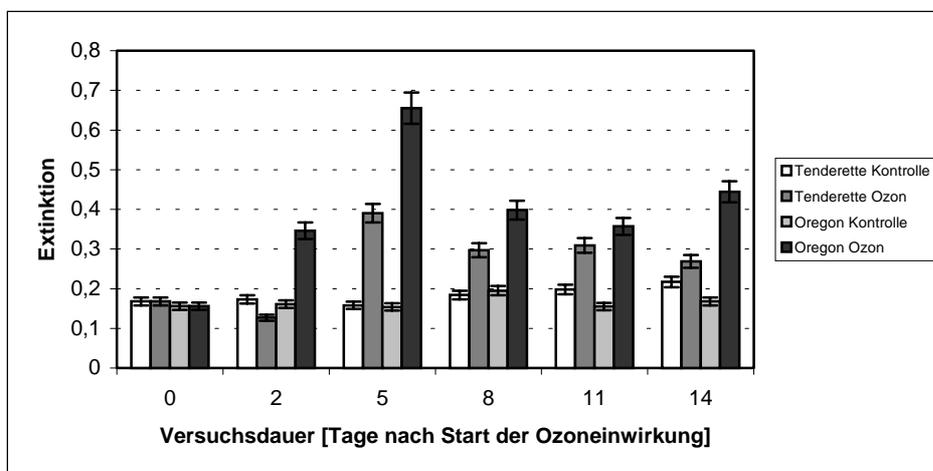


Abb. 55: Akkumulation von Radikalen im Apoplasten von *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' und *Phaseolus vulgaris* 'Oregon' unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen

## 4 Diskussion

### 4.1 Das antioxidative Ascorbat-Glutathion-System: Stabilität, Plastizität, Labilität

Die Bandbreite pflanzlicher Reaktionen auf variierende Umweltbedingungen kann über unterschiedliche Termini definiert werden. Stabilität, Plastizität, Labilität stellen Beschreibungen verschiedener physiologischer Reaktionen und Zustände dar. Ein stabiles System ist dabei keineswegs starr, sondern zeigt auch plastische Reaktionsmuster. Es erhält sogar erst aufgrund seiner Fähigkeit zur Flexibilität seinen insgesamt stabilen Charakter. Eine klare Trennung der Begriffe ist schwierig und bei Systembeschreibungen auch nicht zwingend erforderlich.

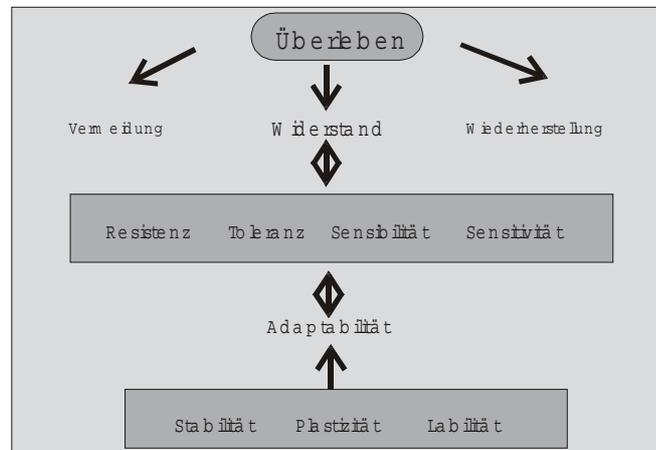


Abb. 56: Reaktionen von Pflanzen auf variierende Umwelteinflüsse. Problematik einer Terminologie in der ökophysiologischen Nomenklatur und der Systemnomenklatur. (Erläuterungen siehe Text.)

Primäres Ziel eines Organismus (keineswegs nur unter Stressbedingungen) ist das Überleben (Abb. 56). Um dieses zu erreichen, stehen prinzipiell verschiedene Wege offen. Diese werden in unterschiedlichem Ausmaß und unterschiedlichen Kombinationen verwirklicht. Auf die Stichworte „Vermeidung“ (räumlicher und/oder zeitlicher Rückzug) und „Wiederherstellung“ (Regeneration) soll an dieser Stelle nicht vertieft eingegangen werden. Die vorliegende Arbeit ist vielmehr im Bereich des „Widerstandes“ angesiedelt, und hier in einem Teilsystem pflanzlicher Abwehrreaktionen, dem Ascorbat-Glutathion-System (auch unter dem Namen *Halliwell-Asada*-System in der Literatur zu finden). Der Grad des Widerstandes bzw. die Belastbarkeit eines Systems wird zumeist über die Begriffe Resistenz, Toleranz, Sensibilität und Sensitivität beschrieben. Sie können auch als Ausdruck der Adaptationsfähigkeit der Pflanze gesehen werden. Wie und in welchem Rahmen eine Anpassung erfolgt ist genetisch bedingt. Das Ausschöpfen dieses genetisch vorgegebenen Potentials wird über die gegebenen Umweltbedingungen eingeleitet. Die Art der pflanzlichen Reaktionen und der daraus resultierenden Zustände beschreiben Termini wie Stabilität, Plastizität und Labilität.

Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass die Begriffe unterschiedliche Bedeutungen haben (können). In der ökophysiologischen Nomenklatur beschreibt der Begriff Stabilität die Eigenschaft eines Systems einer „äußeren Störung entgegenzuwirken“ und nach Aufhören der Störung über „auftretende Rückstellkräfte“ den „stabilen“ Ausgangszustand wieder zu erreichen. Demgegenüber beschreibt der Begriff Plastizität die Eigenschaft „Merkmale unter dem Einfluss von Umweltfaktoren zu verändern“. Unter dem Begriff Labilität wird die Neigung eines Systems verstanden, „sich infolge innerer oder äußerer Faktoren irreversibel zu verändern“. Die Systemnomenklatur stimmt hinsichtlich dieses Begriffes mit der Ökophysiologie überein. Unterschiede bestehen bezüglich der beiden anderen Begriffe. Im Rahmen der Stabilität ist laut Systemnomenklatur eine gewisse flexible Anpassung denkbar. Es besteht auch die Möglichkeit Veränderungen zu zeigen, d.h. plastisch zu reagieren. Ein Charakteristikum ist hierbei eine Schwellenüberschreitung. Als Folge hiervon kann entweder ein neues stabiles Niveau oder ein labiler Zustand entstanden sein, der letztendlich zum Zusammenbruch führen wird. Letzteres zeigte sich im Rahmen der durchgeführten Versuche an den *Phaseolus*-Pflanzen; und dort in den Bereichen der nekrotischen Läsionen. Die ozonsensitive Varietät ‘Oregon’ zeigte diese Läsionen nach der Ozoneinwirkung verstärkt. In diesen Blattbereichen war es (nicht nur dem Ascorbat-Glutathion-System) nicht mehr möglich einen „neuen“ stabilen Zustand einzustellen: Das System kollabierte. Gegenteiliges zeigte sich bei der Betrachtung der Glutathion-Mengen der Gesamtblattuntersuchungen (siehe auch Abb. 12). So zeigten die vorliegenden Ergebnisse sehr deutlich, dass hier im Bereich von 10 – 12 Tagen eine Schwellenüberschreitung erfolgte. Das stabile Niveau, das sich zu Beginn einstellte, konnte (im weiteren Versuchsverlauf) nicht länger aufrecht erhalten werden. Das System hatte jedoch die Möglichkeit einer flexiblen Anpassung. Das Überschreiten einer Schwelle bedeutete einen „Neubeginn“ auf einem anderen wiederum stabilen Niveau. Das Überleben des Gesamtorganismus war aufgrund dieser plastischen Komponenten innerhalb des stabilen Gesamtkonzeptes gewährleistet. Dieser Verlauf eines Phasenüberganges, d.h. der Sprung von einem stabilen Niveau auf ein zweites war auch bei Betrachtung der Glucose-6-Phosphat-Mengen (Abb. 15) und bei Aktivitätsmessungen der Dehydroascorbatreduktase (Abb. 21) erkennbar.

## 4.2 Einordnung von *Phaseolus* in die allgemeine Terminologie

Die Anwendung der Begriffe „Resistenz“, „Toleranz“, „Sensibilität“ oder „Sensitivität“ erfolgt nicht immer problemlos. Unter Zugrundelegung allgemeiner Definitionen werden Pflanzen der Gattung *Phaseolus* als sensitiv eingestuft (Lee et al. 1984). Hierbei wird das Auftreten von sichtbaren Symptomen wie Nekrosen, Chlorosen und „Wasserflecken“ bereits bei geringen Ozonkonzentrationen (1 Stunde Ozoneinwirkung) als Kriterium angenommen. Auch die durchgeführten Untersuchungen an *Phaseolus vulgaris* zeigten, dass nach Behandlung mit 30 ppb Ozon – addiert zur Außenluft – nach 8 Tagen bei einer der beiden verwendeten Varietäten (‘Oregon’) einzelne Chlorosen zu erkennen waren, die sich im weiteren Verlauf von 4-6 Tagen zu deutlichen Nekrosen – auch als *stiplings* bezeichnet – ausweiteten. Mit der Varietät ‘Oregon’ wurde also die in der Literatur getroffene Einteilung bestätigt. Die Beobachtungen an der zweiten in den Versuch einbezogenen Varietät (‘Tenderette’) widersprachen jedoch dieser allgemeinen Einteilung. Hier war erst nach deutlich längeren Ozoneinwirkungszeiten ein Auftreten phänotypisch sichtbarer Ozonschäden in Form von *stiplings* zu

erkennen. Ähnlich lange Zeiträume bis zu dem ersten Auftreten solcher Schäden wurden auch für Karotten und Rüben beschrieben, Pflanzen, die allgemein als ozontolerant beschrieben wurden. Sichtbare Schäden, speziell in Form brauner, nekrotischer, tupfenförmiger Ausbreitungen wurden bei Nadeln von *Pinus sylvestris* erst nach 10 Tagen Ozoneinwirkung beobachtet (Zinser et al. 2000).

Auch bei höheren Ozonkonzentrationen war zu beobachten, dass bei der Varietät 'Oregon' deutlich früher als bei 'Tenderette' Ozon-bedingte Schädigungen auf den Blattspreiten auftraten.

Für die untersuchten Bohnenvarietäten zeigte sich, dass die in der Literatur häufig beschriebene Sensitivität von Pflanzen (und hier häufig von Kulturpflanzen) gegenüber troposphärischem Ozon (Heagle 1989; Runneckles Chevone 1992; Sandermann 1996) auch bei einem Teil der Bohnenvarietäten zutreffend war. Aber auch für *Phaseolus vulgaris* war festzustellen, dass bei dieser Spezies verschiedene Genotypen mit unterschiedlicher Sensitivität vorkommen können (Wellburn, Wellburn 1996) und die häufig zu findenden verallgemeinernden Einteilungen ganzer Gattungen nur begrenzt aussagekräftig sind.

Der Vergleich zwischen den beiden Varietäten 'Oregon' und 'Tenderette' belegte die bereits erwähnte Problematik der Terminologie. Es kann im Bezug auf *Phaseolus vulgaris* nicht uneingeschränkt von „Resistenz“ gesprochen werden, da dies per Definition die anlagemäßig bedingte erhöhte Widerstandsfähigkeit einer Pflanze gegen einen schädigenden Einfluss bedeutet. Demgegenüber wird für „tolerante“ Pflanzen eine begrenzte Widerstandsfähigkeit gegenüber schädlichen äußeren Einflüssen beschrieben. Auf den Varietätenunterschied bezüglich des Verhaltens von 'Oregon' und 'Tenderette' gegenüber Ozon, der sich in dem verzögerten Auftreten von Schäden bei 'Tenderette' manifestierte, ist bei 'Tenderette' die Anwendung des Begriffs „Toleranz“ angezeigt, wenn man den oben genannten Definitionen folgen will.

Im deutschen Sprachgebrauch kann der Begriff „Sensitivität“ (zugeordnete Definition: Überempfindlichkeit) durch „Sensibilität“ (zugeordnete Definition: Empfindlichkeit) ersetzt werden (Abb. 56). Auch Burkey et al. (2000) kennzeichneten die bei ihren Versuchen verwendeten verschiedenen *Phaseolus vulgaris* Varietäten mit den Bezeichnungen „sensitiv“ und „tolerant“. Aber mit Sicherheit sollte nicht nur im Hinblick auf *Phaseolus vulgaris* die Überlegung abgebracht sein, jeweils einem Begriff den Vorzug zu geben und dann von unterschiedlichen Graden von Toleranz (alternativ Sensitivität) zu sprechen. Dies gründet in der angesprochenen Beobachtung, dass im Verlauf der vorliegenden Untersuchungen unter allen gewählten Versuchsbedingungen beide *Phaseolus* Varietäten äußerlich sichtbare Ozonschäden aufwiesen. Der Unterschied lag alleine im variierenden Zeitraum (kürzere Zeiträume bei 'Oregon', längere Zeiträume bei 'Tenderette'), der zwischen Beginn der Behandlung und Eintritt der erkennbaren Schädigung verstrich. Für *Phaseolus vulgaris* heißt dies, dass bei der toleranten Varietät eine Verlängerung dieses Zeitraumes zu beobachten war und somit eine begrenzte Widerstandsfähigkeit vorlag. Ein vollständiges Ausbleiben von Nekrosen war aber nicht der Fall.

### 4.3 Seneszenzerscheinungen unter Ozoneinfluss

Eine weitere Reaktion von *Phaseolus* auf Ozon war eine verfrüht einsetzende Seneszenz. Phänotypisch war ein Vergilben der Blätter zu erkennen. Gleichzeitig zeigten sich Turgeszenzverluste und in der Folge früher Blattabwurf. Diese Erscheinungen zeigten

sich zuerst bei den Primärblättern und weiteten sich danach von einer Blattetage zu nächsten aus. Der zeitliche Verlauf der Vergilbungserscheinungen entsprach dem wie er bereits für das Auftreten von Nekrosen beschrieben wurde. Der Zusammenhang zum Ozonereignis war somit gegeben. Das verfrühte Einsetzen der Seneszenz unter Ozon ist auch bei *Arabidopsis* bekannt. Vergilbungserscheinungen wurden für die älteren Blätter auch hier beschrieben (Miller et al. 1999). Bei *Phaseolus* begann die vorzeitige Blattalterung in der „ältesten“, d.h., in der zuerst mit vollständig entfalteten Blättern versehenen Blattetage. Dies sind die sog. Primärblätter, die sich morphologisch deutlich von den Folgeblättern unterscheiden. Die Blattalterung setzte sich von Blattetage zu Blattetage fort. Im Varietätenvergleich zeigte sich, dass bei den mit Ozon behandelten Pflanzen zuerst bei *Phaseolus vulgaris* ‘Oregon’ Seneszenzerscheinungen auftraten und zwar deutlich früher als bei der toleranten Varietät ‘Tenderette’. Ebenso war dies bei den behandelten Pflanzen früher zu verzeichnen als bei den Kontrollpflanzen ohne Ozonbehandlung. Die hier beschriebenen Seneszenzphänomene, die auch Turgeszenzverluste der behandelten Blätter mit einschlossen, zeigen die Komplexität der pflanzlichen „Antwortreaktionen“ auf Ozon. Auf unterschiedlicher Ebene, aber zeitlich und räumlich koordiniert, spielten sich diese veränderten Reaktionen in der Pflanze ab.

Langzeit-Behandlungen mit niedrigen Ozonkonzentrationen (sog. chronische Ozoneinwirkung) verursachen zumeist Veränderungen auf physiologischer, d.h., metabolischer Ebene wie Senkung der Photosyntheserate, Zunahme der Ionen-*leakage*, und verfrühte Seneszenz (Lucas et al. 1993; Mikkelsen et al. 1995; Pell et al. 1997). Die Applikation hoher Ozonkonzentrationen (auch über kurze Zeiträume) führt zumeist zu akuten Schäden – charakteristisch sind nekrotische Bereiche, die in relativ kurzer Zeit (Stunden) entstehen (Wingsle et al. 1992; Sakaki et al. 1994; Ciompi et al. 1997).

Physiologische Reaktionen innerhalb der Seneszenz sind „primär aber nicht ausschließlich von degradativen und remobilisierenden Aktivitäten“ bestimmt (Chandlee 2001). Des Weiteren sind Änderungen in der Genexpression und (als Folge) in den Proteinausstattungen zu nennen. Phänotypisch sichtbar sind Veränderungen der Pigmentgehalte und deren Zusammensetzung (Chlorophylle, Karotinoide). Unter Kontrollbedingungen kultivierte *Phaseolus*-Pflanzen zeigten Seneszenzerscheinungen, die phänotypisch sichtbar über Chlorophyllabbau gekennzeichnet waren. Der Alterungsprozess und somit verminderter Chlorophyllgehalt setzte bei beiden untersuchten Varietäten unter Ozoneinfluss früher ein. Die Abnahme des Chlorophyllgehaltes ist neben der Beeinflussung der RubisCO zumeist mit einer Reduktion der Photosyntheserate – einem weiteren Erscheinungsbild der Seneszenz – verbunden (Nie et al. 1993). Diskutiert wird, dass Seneszenz mit erhöhtem oxidativen Stress einhergeht und eine Abnahme der antioxidativen Aktivität zu verzeichnen ist (Prochazkova et al. 2001), bzw. Antioxidantien regulierend und modulierend auf die Seneszenzdynamik einwirken (Hodges, Forney 2000). Die Abnahme von Chlorophyllen und Karotinoiden wurde auch bei anderen Versuchen mit Ozon festgestellt (Mikkelsen et al. 1995; Alonso et al. 1999+2001). Dabei wurde diese Reduktion allgemein als Folge der durch Ozon induzierten verfrühten Seneszenz gedeutet.

Zu Beginn des Versuches zeigte sich bei beiden *Phaseolus*-Varietäten im Vergleich zu den Kontrollpflanzen unter Ozoneinfluss eine Abnahme der Karotingehalte. Diese Abnahme konnte auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass Karotine als antioxidativ wirksame Moleküle im „scavenging“ von Singulett-Sauerstoff, der bei der Reaktion von angeregtem Chlorophyll im Triplett-Stadium mit O<sub>2</sub> entsteht, wirksam sind. Die Abnahme von Karotin war bei der toleranten Varietät ‘Tenderette’ deutlicher ausgeprägt

und über den gesamten Versuchsverlauf zu beobachten. Im Falle der sensitiven Varietät 'Oregon' waren unter Ozoneinwirkung deutlich höhere Karotingehalte zu messen. Inwieweit die Abnahme der Karotinmengen mit kontinuierlich ablaufenden *scavenging*-Prozessen korreliert war, konnte nicht mit Sicherheit gesagt werden. Untersuchungen an Pappel-Klonen zeigten gegensätzliche Befunde. Stärkere Abnahmen der Karotingehalte im sensitiveren Klon unter Ozon wurden mit gleichzeitig daraus resultierender verminderter antioxidativer Fähigkeit beschrieben (Ranieri et al. 2000). Aber auch hier musste die Frage offen bleiben, inwieweit Karotinverluste in Folge von Ozoneinwirkung in Beziehung mit der unterschiedlichen Sensitivität gegenüber oxidativen Stress steht. Ein weiteres Kriterium, das bei der Einschätzung von Ozonschädigungen und damit verbunden dem frühen Einsetzen von Seneszenz zugrunde gelegt wird, ist die Menge der löslichen Proteine. Die Fraktion der löslichen Proteine zeigte sich bei *Phaseolus* tendenziell von Ozon beeinflusst. Diese Tendenz in Form einer Abnahme der Proteinmenge war bei 'Tenderette' deutlicher zu erkennen. Quantitative und qualitative Änderungen von Proteinmengen nach Ozoneinwirkung wurden auch für Fichten (Schmitt, Sandermann 1990) bzw. Weizen (Nie et al. 1993) beschrieben. Auch für die RubisCO, einem innerhalb der löslichen Proteinfraction mengenmäßig stark vertretenen Enzym, wurde von deutlichen Veränderungen unter Ozon berichtet (Pell, Pearson 1983). *De-novo*-Synthesen von Enzymen, u.a. von den *Halliwell-Asada*-Enzymen (Sävenstrand et al. 2000), den sog. *pathogen-responsive*-Proteinen (PR-Proteine; Eckey-Kaltenbach et al. 1994), den *disease-resistance-response*-Proteinen, Extensinen, Lipid-transfer-Proteinen und Proteinen, die in der Zellwand bzw. Plasmamembran lokalisiert sind, sind bei der Proteinbestimmung von Bedeutung. Die Vielfältigkeit möglicher Einflussfaktoren auf die Proteinmenge, spez. bei der löslichen Fraktion, lies die im Versuch erkennbaren Tendenzen auch nur als solche beschreiben und machte Interpretationen schwierig. Sehr viel spezifischer war die Untersuchung spezieller antioxidativer Reaktionskaskaden in den Pflanzen.

#### 4.4 Biochemische Gesamtblattanalysen des antioxidativen Systems

Als Bestandteile des antioxidativen Systems (Chaudiere, Ferrari-Iliou 1999) wurden die Redoxpaare Ascorbat und Glutathion, sowie die Enzyme Ascorbatperoxidase, Dehydroascorbatreduktase, Glutathionreduktase, Katalase und unspezifische-(Guajacol-abhängige)-Peroxidasen analysiert. Als Donatoren der *reducing power* wurden NADP(H) und NAD(H) gemessen. Als regeneratives System für NADPH und somit ausschlaggebendes Donorsubstrat wurde Glucose-6-Phosphat und entsprechend Glucose-6-Phosphatdehydrogenase untersucht.

##### 4.4.1 Analyse nicht-enzymatischer Bestandteile

Pflanzen enthalten einen hohen Level an **Ascorbat**, verteilt in den verschiedenen Zellkompartimenten. Ascorbat übt (nicht nur bei Pflanzen) umfassende Funktionen aus (Smirnoff 1996; Conklin 2001) und ist in der vorliegenden Arbeit vor allem in seiner Rolle bei Radikal-*scavenging* Prozessen von Bedeutung. Pflanzliche Abwehrreaktionen gegen oxidativen Stress mittels Ascorbat können vielfach demonstriert werden (Córdoba, González-Reyes 1994, Plöchl et al. 2000).

In den vorliegenden Versuchen zeigte sich jedoch die Ascorbatmenge in Gesamtblattextrakten von *Phaseolus* bei beiden Varietäten unter Ozoneinfluss im Vergleich zu den Kontrollpflanzen unverändert. Auch im Varietätenvergleich konnte die beobachtete unterschiedliche Ozonsensitivität nicht über unterschiedliche Ascorbatmengen in den Gesamtblattextrakten in Bezug genommen werden. Im Gegensatz dazu zeigten sich in Untersuchungen von Burkey et al. (2000) – ebenfalls an *Phaseolus vulgaris* – neben der unmittelbaren Beeinflussung von Ozoneinwirkung und Ascorbatmenge ein Zusammenhang zwischen Ascorbatmengen und Ozonsensitivität. Er beobachtete in seinen Untersuchungen, dass die Ascorbatmenge unter Ozoneinfluss variierte und dass die Pflanze, die als sensitivste Varietät eingestuft wurde, die geringsten Werte aufwies. Im Vergleich von weniger sensitiven und den deutlich toleranten Varietäten zeigten sich jedoch keine Unterschiede. Dies unterstrich, dass die Unterschiede in der Sensitivität der untersuchten *Phaseolus*-Pflanzen nicht ausschließlich über das Ascorbat-Glutathion-System zu erklären waren.

Für eine Mutante von *Arabidopsis* mit reduzierten Ascorbatmengen in Gesamtblattextrakten wurde eine extreme Ozonsensitivität im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen beschrieben (Conklin 2001). Die von Burkey et al. (2000) vermutete Notwendigkeit einer Mindestmenge an Ascorbat zum Schutz oxidativer Belastung konnte damit unterstützt werden. Hier war nicht nur die direkte Wirkung des Ascorbats von Bedeutung, auch die stabilisierende Wirkung des Ascorbats u.a. auf die Ascorbatperoxidase musste in diesem Zusammenhang bedacht werden. (Auch in Zusammenhang mit den vorliegenden Untersuchungen der apoplastischen Ascorbatperoxidase war die stabilisierende Wirkung des Ascorbats festgestellt worden, siehe unten) Ob es eine „optimale“ Menge von Ascorbat für eine maximale Schutzfunktion gibt und in welcher Höhe diese unter den unterschiedlichen Umweltbedingungen und Entwicklungsmustern liegt, ist aufgrund der Netzwerkstruktur pflanzlicher Reaktionskaskaden nicht ohne Modulationen mit erheblichen Rechenaufwand zu sagen. Burkey et al. (2000) vermuteten in dieser Beziehung einen sog. kritischen Schwellenwert für die Ascorbatmenge. Werte deutlich über diesem Schwellenwert sind zur Erlangung von „Toleranz“ von Nöten. Nicht vergessen werden darf jedoch in diesem Zusammenhang die zelluläre Struktur und damit die Verfügbarkeit von Ascorbat in den unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle. Auch dieser Zusammenhang wird später noch eingehender behandelt.

Ein weiterer bedeutender Aspekt war der Redox-Status des Moleküls. Dies galt nicht nur für Ascorbat, sondern auch wie später noch gezeigt, für Glutathion. In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine vorübergehende Verschiebung des Redox-Status von Ascorbat um bis zu 20 % unter Ozon beobachtet. Die tolerante Varietät 'Tenderette' reagierte hierbei deutlich schneller mit einer entsprechenden Verschiebung des Verhältnisses. Bereits nach 8 Tagen waren hier höhere Dehydroascorbatmengen zu verzeichnen. Die genannten Ergebnisse stehen bezüglich des Ascorbats im Gegensatz zu den Untersuchungen von Burkey et al. (2000). In dieser Studie waren bei den dort gewählten Ozonkonzentrationen keine signifikanten Effekte der Verhältnisse von Ascorbat/Dehydroascorbat und auch Glutathion<sub>red</sub>/Glutathion<sub>ox</sub> zu verzeichnen. Beide antioxidativen Metaboliten waren hier überwiegend in der reduzierten Form vorhanden. Der Redox-Status bestimmte sowohl die Funktions- als auch Reaktionsfähigkeit von Ascorbat und Glutathion. Die direkte Reaktion und damit Detoxifikationsfähigkeit von Ascorbat mit Ozon und dessen Folgeprodukten (ROS) erfolgte über die reduzierte Form des Moleküls und resultiert in einem Anstieg der oxidierten Form (Polle et al. 1995). Der Redox-Status von Ascorbat und Glutathion reagiert auch auf andere Stressoren

sensitiv (Cuypers et al. 2001). Auch weitere Ascorbatwirkungen, wie die Reduktion anderer antioxidativer Moleküle (z.B. apoplastische Phenole oder Tocopherol), die ebenfalls von Ozon oxidiert werden können (Córdoba-Pedregosa et al. 1996), gehen vom reduzierten Ascorbat aus. In *Phaseolus* lagen unter „Normalbedingungen“ ca. 95 % des Ascorbats (Gesamtblatt) in der reduzierten Form vor. Dabei zeigten sich Kompartiment-abhängige Unterschiede. Im Chloroplasten liegen 96 % des Ascorbats in der reduzierten Form vor (Law et al. 1983), im Apoplasten geht man von 90 % reduziertem Ascorbat aus (Ranerie et al. 1999). Eine mögliche Reaktion von reduziertem Ascorbat mit verschiedenen oxidierten Verbindungen zeigt sich in einer Verschiebung des Ascorbat/Dehydroascorbat-Verhältnisses (Nakano, Asada 1981; Dalton 1986).

Eine schneller eintretende Erhöhung der Dehydroascorbatmenge und damit eine Verschiebung der Redox-Verhältnisse wie es bei den Untersuchungen der toleranten Varietät 'Tenderette' sichtbar wurde, ließ vermuten, dass hier eine für die Pflanze effektivere (da schnellere) Reaktion von Ascorbat mit oxidativen Substanzen erfolgte. Im Gegensatz bedeutete dies für die weniger tolerante Varietät 'Oregon', dass hier vor Einsetzen der (verspäteten) Reaktion des Ascorbats Schädigungen eintreten konnten. Eine Möglichkeit, die sich in den früher auftretenden sichtbaren Schäden widerspiegelte.

Ein vorübergehender Anstieg der oxidativen Form der Metaboliten mit darauffolgender Regeneration konnte auch für die Reaktion von Glutathion auf Metallbelastungen in *Phaseolus*-Blättern beobachtet werden (Cuypers et al. 2000). Auch hier zeigte sich das charakteristische Bild (in Abb. 6 für Ascorbat gezeigt). Aber auch gegenteilige Beobachtungen sind zu verzeichnen. Spinatblätter zeigten bezüglich des intrazellulären Redox-Status von Ascorbat keinerlei Veränderungen nach Ozon (Luwe et al. 1993). Reaktionen des Ascorbats spielten sich hier im Apoplasten ab. Eine Beobachtung, die sich auch in der vorliegenden Arbeit zeigte (siehe unten).

Ein weiterer sehr wichtiger antioxidativ wirksamer Metabolit im Ascorbat-Glutathion-System ist das **Glutathion** (Renneberg, Brunold 1994). Unter der katalysierenden Reaktion der Dehydroascorbatreduktase wird mittels reduziertem Glutathion (auch hier ist die reduzierte Form die aktive Form) Dehydroascorbat reduziert und somit dem System wieder verfügbar gemacht. In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich bezüglich der Gesamtglutathionmengen ein sehr heterogenes Bild. Varietäten-bedingte Unterschiede zeigten sich bereits unter Kontrollbedingungen. Deutlich höhere Gesamtglutathionmengen waren bei der sensitiven Varietät 'Oregon' zu messen. Inwieweit dieser Varietätenunterschied bereits eine „Stressantwort“ darstellte (Kontrollbedingungen bedeuten ja nicht zwangsläufig „Stress“-freie Bedingungen), konnte unter den gegebenen Umständen nicht ermittelt werden. Ein solcher Varietätenunterschied wurde auch von Burkey et al. (2000) für die in seiner Studie verwendeten Bohnenkultivare beschrieben. Hinsichtlich der beiden Varietäten 'Tenderette' und 'Oregon' war in seinen Untersuchungen jedoch die tolerante Varietät diejenige mit der höheren Glutathionmenge in Gesamtblattextrakten. Im Vergleich aller von ihm untersuchten Genotypen konnte aber nicht generell von einem Zusammenhang zwischen höheren Glutathionmengen und einer entsprechenden Toleranz gesprochen werden. Ein Umkehrschluss konnte aus den Studien von Xiang et al. (2001) gezogen werden. Pflanzen der Gattung *Arabidopsis* mit niedrigeren Glutathionmengen waren sensitiver gegenüber einer Vielzahl von Umweltstressoren - einschließlich Ozon - als Wildtyp-Kontrollen. (Auch zeigte sich a) das plastische Verhalten von Pflanzen gegenüber den

gewählten Umweltbedingungen und b) die Verknüpfungen einzelner dem Anschein nach „unabhängiger“ Umweltparameter in einer Versuchsreihe und mahnte vor vorschnellen Verallgemeinerungen.)

Bei den hier untersuchten *Phaseolus*-Pflanzen resultierte Ozon bei beiden Varietäten in einem Anstieg an Gesamtglutathion in den Gesamtblattextrakten. Übereinstimmend dazu waren Ergebnissen in Gerste, hier führte eine akute Ozoneinwirkung zu einem Anstieg der Gesamtglutathionmenge (Price et al. 1990) und in Pappel-Blättern sogar zu einer Verdopplung (SenGupta et al. 1991). Gegensätzliches fand Burkey (Burkey et al. 2000) bei seinen Untersuchungen an Bohnen, und auch bei Untersuchungen an Fichtensämlingen (Hausladen et al. 1990) zeigten sich in Abhängigkeit der applizierten Ozonmenge und Behandlungszeit bei sogenanntem chronischen Ozon keine Veränderungen in den Glutathionmengen. Erhöhte Glutathionmengen nach Stressapplikation war auch für Kältestress (Alscher 1989), Trockenheit (Navari-Izzo et al. 1997), Metalltoxizität (Dixon et al. 1998; Cuypers et al. 2000) und bei Virusinfektionen (Gullner et al. 1999) charakteristisch (Noctor et al. 1998). Die Begriffe chronisch und akut wurden in der gesichteten Literatur jedoch nicht immer scharf abgegrenzt.

Die in 'Oregon' unter Kontrollbedingungen erhöhte Glutathionmenge (erhöhte Menge reduziertes, also aktives Glutathion) konnte unter Ozoneinwirkung augenscheinlich keine „Schutzfunktionen“ ausüben. Eine evt. Schutzfunktion durch Glutathion zeigten sich in Studien mit kälteresistenten Erbsen. Als Folge von Kälte-„Stress“ waren nur geringfügigen Glutathion-Verlusten (ohne gleichzeitige GSSG Akkumulation) zu verzeichnen womit eine geringe Photooxidationsraten einherging und auch eine Lipidperoxidation vermieden werden konnte. Demgegenüber fand sich bei kältesensitiven Kürbis-Pflanzen unter Kältestress verstärkt Photooxidation und Lipidperoxidation in Verbindung mit einer beträchtlichen Akkumulation von GSSG und gleichzeitiger Abnahme der Gesamtglutathionmenge (Wise, Naylor 1987). Daraus ließ sich ableiten, dass nicht nur die Mengen des reduzierten Glutathions ausschlaggebend war. Ein Anstieg der oxidierten Form und eine evt. damit verbundene Akkumulation können den Metabolismus einer Pflanze nachhaltig beeinflussen.

In den vorliegenden Untersuchungen hatte Ozon keinerlei (messbaren) Effekt auf das Verhältnis von Glutathion<sub>red</sub>/Glutathion<sub>ox</sub>, d.h., auch unter Stressbedingungen lagen ungefähr 98 % des Gesamtglutathions in der reduzierten Form vor. Eine Beobachtung die auch von Burkey et al. (2000) in seinen Studien mit verschiedenen Bohnenpflanzen beschrieben wurde. Wie bereits im Fall des Ascorbats gezeigt wurde, ist auch bei Glutathion die reduzierte Form die aktive. In einigen Fällen konnte mit einem Anstieg von Glutathion (aber auch mit einem Anstieg des Glutathion<sub>red</sub>/Glutathion<sub>ox</sub>-Verhältnisses) eine Erhöhung der Resistenz gegen oxidativen Stress verbunden werden (Dalton et al. 1986; Skrivastava, Dwivedi 1998; Roxas et al. 2000). Auch die Rolle des reduzierten Glutathions in Verbindung mit Cytochrom c bei der Induktion der Apoptose (s.u.) spiegelte die Besonderheit des Redoxzustandes dieses Moleküls wieder.

Untersuchungen von Rao und Davies (1999) zeigten in diesem Zusammenhang, dass Ozon bei konstanten Gesamtglutathionmengen durchaus einen Einfluss auf das vorhandene Glutathion<sub>red</sub>/Glutathion<sub>ox</sub>-Verhältnis haben konnte. Ozon bewirkte bei einer untersuchten *Arabidopsis*-Mutante eine Reduktion dieses Verhältnisses von bis zu 50 %. Die Bedeutung der Redox-Verhältnisse von Glutathion wurde auch in anderen Studien beschrieben (May et al. 1998; Noctor, Foyer 1998; Mullineaux et al. 2000;

Pfannschmidt et al. 2001). Zudem wurde eine Signalwirkung des Glutathions - nicht nur in Verbindung mit der HR (May et al. 1998) – diskutiert (Mullineaux, Creissen 1997). Nach Mehdy (1994) war innerhalb der Regulation von abwehrspezifischen Genexpressionen das zelluläre Glutathion<sub>red</sub>/Glutathion<sub>ox</sub>-Verhältnis wichtiger als die absoluten Mengen der beiden Formen.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten unveränderten Glutathion<sub>red</sub>/Glutathion<sub>ox</sub>-Verhältnisse (Gesamtblattebene nach Ozonwirkung) sollten hier jedoch nicht im Gegensatz zu dem oben dargestellten verstanden werden. Ozon wies einen deutlichen Einfluss auf das Glutathion im Apoplasten auf (siehe unten).

Die kinetische Betrachtung der Mengenveränderungen des Glutathions zeigten bei *Phaseolus* deutliche Schwankungen. Vielfach wurden ähnliche Schwankungen von Glutathionmengen als diurnale Fluktuationen (Peltzer, Polle 2001) oder auch als saisonale Schwankungen (Taulavuori et al. 1999) beschrieben. Auch eine Abnahme als Folge des Alterns der Pflanze konnte gezeigt werden (Prochazkova et al. 2001). Im Fall von *Phaseolus* war aber keine lineare Abnahme zu beobachten, vielmehr war (wie bereits beschrieben) mit dem Absinken von einem Niveau auf ein zweites eine typische Schwellenwertreaktion zu verzeichnen. Die Behandlung der *Phaseolus*-Pflanzen mit Ozon hatte neben den bereits beschriebenen Mengenveränderungen des Glutathions Änderungen der Schwellenwertreaktion zur Folge. Die Überschreitung der Schwelle und in der Folge der „Niveau-Sprung“ fanden zeitlich verzögert statt. Das bedeutete, dass unter Ozon nicht nur eine weiterhin hohe Syntheserate von Glutathion zu beobachten war, das Ozon verzögerte gleichzeitig den Übergang in eine neue Entwicklungsphase. Dass dieser Verlauf kein Einzelfall war, zeigte die Messung von Glucose-6-Phosphat dem zentralen Elektronen-Donator des cytoplasmatischen Pentose-Phosphat-Pathways (PPP). Im Bereich zwischen dem 8. und 12. Tag verminderten sich die Glucose-6-Phosphat-Mengen in den Gesamtblattextrakten sprunghaft von dem zu Beginn des Versuches vorliegenden Niveau auf ein um 40 % reduziertes Niveau. Ozon führte nun bei den beiden Varietäten dazu, dass dieses Absinken der Ausgangsniveaus zu einem früheren Zeitpunkt stattfand. Bei der sensitiven Varietät 'Oregon' lag das den „späteren“ Entwicklungsstatus kennzeichnende zweite Niveau auf der selben Höhe wie das der Kontrollpflanzen. Bei der toleranten Varietät 'Tenderette' lag das zweite Niveau um 40 % unter dem Niveau der Kontrollpflanzen.

Die unmittelbar von Glucose-6-Phosphat beeinflussten Coenzympaare NADP/NADPH, und NAD/NADH zeigten ein sehr heterogenes Verhalten. Die NADP(H)-Mengen in den Gesamtblattextrakten wurden innerhalb der vorliegenden Versuche durch Ozon nicht beeinflusst. Eine Beobachtung die auch Gupta et al. (1991) in Experimenten mit Pappeln machten. Die NAD(H)-Mengen jedoch waren in den behandelten *Phaseolus*-Pflanzen durchgehend erhöht.

Die zeitlichen Verläufe der NADPH- und NADH-Mengen zeigten in Anhängigkeit des Alterns eine Tendenz zur Reduktion. Dies trat bei der Messung von NADH deutlicher zutage. Ältere Pflanzen(teile) hatten geringere NADH-Mengen. Diese schon bezüglich Glutathion und Glucose-6-Phosphat gemachte Beobachtung war somit auch für das Coenzym zu verzeichnen. Die Abnahme erfolgte hier jedoch kontinuierlich. Der Alterungsprozess der Blätter, der sich hier in der NADH-Menge widerspiegelte, war über geringere Stoffwechselraten (geringerer NADH-Bedarf) gekennzeichnet. Eine Beobachtung, die auch an anderer Stelle gemacht wurde (Huffaker 1990; Nooden, Penney 2001; Prakash et al. 2001).

Die Tendenz einer Steigung konnte man dagegen bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufes der Redox-Verhältnisse beider Coenzyme (NADPH/NADP+NADPH und NADH/NAD+NADH) feststellen. Bei beiden Varietäten lagen die Redox-Verhältnisse von NADPH/NADP+NADPH bei den Kontrollpflanzen durchschnittlich um 0,25 und sind keinen größeren Schwankungen unterworfen. Ozon resultierte in einer geringfügigen Verschiebung (0,15), d.h. die Stoffwechselsituation der mit Ozon behandelten Pflanzen wies einen erhöhten Bedarf für NADPH auf. Dieser Bedarf lag bei der sensitiven Varietät 'Oregon' geringfügig höher, die Verhältnisse waren weiter in Richtung NADP verschoben.

Bei der sensitiven Varietät 'Oregon' lag das Verhältnis NADH/NAD+NADH ebenfalls bei 0,25 und zeigte weder über die Zeit noch bei Ozonbehandlung nennenswerte Veränderungen. Bei der toleranten Varietät 'Tenderette' zeigte sich auch die angesprochene Tendenz einer Steigung über die Zeit deutlicher. Ausgehend von einem Verhältnis von 0,35 erfolgte ein Anstieg auf Werte bis zu 0,45, sowohl bei Kontrollen als auch bei den behandelten Pflanzen. Den normalerweise mit Alterungserscheinungen korrelierten verminderten Stoffwechselumsetzungen wurde hier auf Ebene der Coenzyme entgegengewirkt. Entgegengesetztes wurde ja bei den Beobachtungen an Glutathion und Glucose-6-Phosphat festgestellt.

Ausgehend von NADPH (bzw. Glucose-6-Phosphat im regenerativen System - PPP) erfolgte ein Fluss der *reducing power* über Glutathion und Ascorbat und letztendlich auf die „angreifenden“ ROS (z.B.  $H_2O_2$ ). Von letzterem wirkte eine „oxidative Kraft“ in entgegengesetzter Richtung (Abb. 57). Die jeweils „stärkere“ Kraft bestimmte, ob eine Entgiftung erfolgte (ausreichend *reducing power*) oder das System kollabierte („oxidative Kraft“ dominiert). In einer Gesamtbilanzierung über größere Blattbereiche trat bei *Phaseolus* die Extremsituation – der komplette Zusammenbruch des Systems – nicht auf. Es zeigte sich, dass hier die *reducing power* die bestimmende Kraft war. Das System konnte nach erfolgter Entgiftung regenerieren. Ein Zusammenbruch blieb auf lokale Bereiche beschränkt, und stellt sich phänotypisch in den *stiplings* dar.

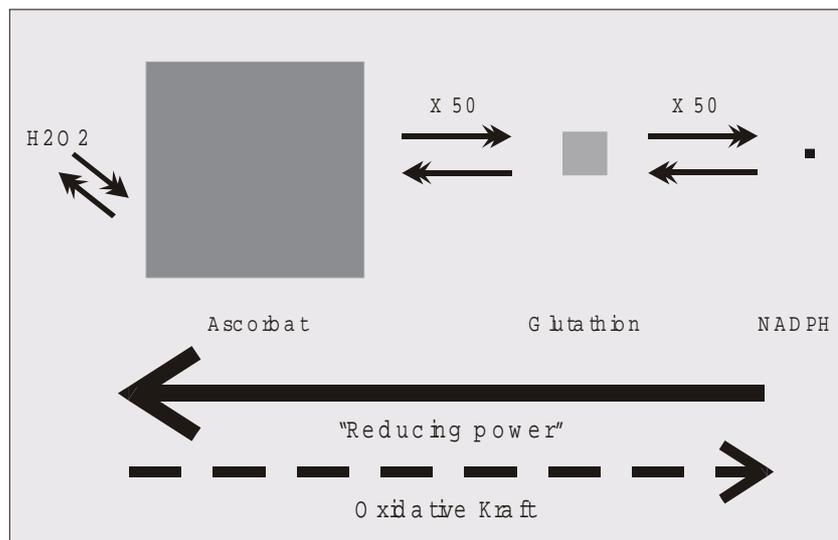


Abb. 57: Größenvergleich der gemessenen Pools der Antioxidantien Ascorbat und Glutathion sowie von NADPH auf Gesamtblattebene. Darstellung von Flüssen der „*reducing power*“ von NADPH in Richtung ROS und eine von den ROS ausgehenden „oxidativen Kraft“ in entgegengesetzter Richtung.

#### 4.4.2 Analyse enzymatischer Bestandteile

Die an *Phaseolus* durchgeführten Messungen zeigten eine Beeinflussung der enzymatischen Bestandteile (u.a. des Ascorbat-Glutathion-Systems) durch Ozon. Im einzelnen war diese Beeinflussung unterschiedlich ausgeprägt. Im zeitlichen Verlauf war erkennbar, dass die **Ascorbatperoxidase**-Aktivität in den Kontrollpflanzen ein Maximum erreichte, das bei ca. 8 Tagen lag. Im weiteren Verlauf jedoch zeigte sich ein deutlicher Aktivitätsrückgang. Die Seneszenz-bedingte Abnahme von Ascorbatperoxidase-Aktivität, vor allem in Mitochondrien und Peroxisomen, wurde auch von Jiménez et al. (1998) beschrieben. Eine derartige Aktivitätsabnahme von Peroxidasen, wie sie in *Phaseolus*-Pflanzen nachweisen werden konnte, zog eine verminderte Leistungsfähigkeit des antioxidativen Systems nach sich und konnte im weiteren zu einer verstärkten Schädigung durch *reactive oxygen species* führen. Auch Ye et al. (2000) beschrieben eine Abnahme der Ascorbatperoxidase-Aktivität im Seneszenzablauf von *Arabidopsis*. Die Verminderung der Ascorbatperoxidase-Aktivität führte auch hier zu einem Anstieg der ROS und darauf folgender Schädigung, speziell durch Lipidperoxidationen. Hodges und Forney (2000) zeigten für Spinatblätter die Abnahme von Ascorbatperoxidase- und Katalase-Aktivität im Seneszenzprozess und schlossen daraus, dass die Regulation des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Levels eine bedeutende Rolle in der Dynamik und dem zeitlichen Ablauf des Seneszenzprozesses spielte.

In der vorliegenden Untersuchung an *Phaseolus* zeigte sich, dass bei beiden Varietäten eine Erhöhung der Ascorbatperoxidase-Aktivität durch Ozoneinwirkung generiert wurde. Der zeitliche Verlauf, verglichen mit den Kontrollpflanzen, zeigte ein nivelliertes Maximum. Das Maximum trat jedoch zeitlich verzögert auf, wurde aber länger aufrecht erhalten. Eine gesteigerte Ascorbatperoxidase-Aktivität konnte der unter oxidativem Stress induzierten Zunahme von ROS entgegenwirken und somit sowohl den tatsächlichen Gehalt an ROS als auch die dadurch verursachten Schäden vermindern. Eine Beobachtung, die auch an *Arabidopsis* gemacht wurde (Wang et al. 1999). Eine Generalisierung, dass eine Erhöhung der Ascorbatperoxidase-Aktivität zwangsläufig eine erhöhte Toleranz bewirkte, war aber nicht möglich, da die Ascorbatperoxidase nur in Abhängigkeit von Ascorbat - und im Rahmen des Ascorbat-Glutathion-Systems abhängig von den Mengen an Coenzyme - agieren kann. Eine Erhöhung der Ascorbatperoxidase-Aktivität unter Stressbedingungen (im Rahmen der Kapazität des Ascorbat-Glutathion-Systems) sowie eine daraus resultierende Toleranz-erhöhung der Pflanzen gegen den applizierten Stress wurde für *Arabidopsis* berichtet (Rao et al. 1996).

Bei den Untersuchungen der **Dehydroascorbatreduktase** zeigte sich, dass Ozon kaum Einfluss auf die gemessenen Aktivitäten hatte. Anhand der Ergebnisse konnten nur Tendenzen erkannt werden. Diese zeigten, dass die tolerante Varietät 'Tenderette' unter Ozon leicht erhöhte Dehydroascorbatreduktase-Aktivitäten aufwies und sich im Gegensatz dazu bei der sensitiven 'Oregon' verminderte Dehydroascorbatreduktase-Aktivitäten unter Ozoneinfluss einstellten. Eine Beobachtung die auch Ushimaru et al. (1997) bei der Untersuchung von Reis unter Ozonstress gemacht hatten. Im Gegensatz zur Ascorbatperoxidase-Aktivität zeigte die Aktivität der Dehydroascorbatreduktase deutlich weniger Beeinflussung durch Ozon. Aber auch das Gegenteil kann der Fall sein. Für *Sedum* zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Aktivität von Dehydroascorbatreduktase durch Ozon (Castillo, Greppin 1988). Bezüglich dieses Enzyms sind daher keine Verallgemeinerungen möglich, zu groß sind die artenbedingten Unterschiede.

Die **Glutathionreduktase** ist ein Schlüsselenzym im  $H_2O_2$ -scavenging-System. Glutathionreduktase-Aktivität ist der limitierende Faktor im „Recycling“ von Glutathion (Nagalakshmi, Prasad 2001). Erhöhte Glutathionreduktase-Aktivitäten wurden für verschiedene Stressoren beschrieben (Oxidativer Stress auf Tabak, Ederli et al. 1997; Metallbelastung auf *Brassica*, Prasad et al. 1999; Ozonstress auf *Arabidopsis*, Rao et al. 1996). Unter Ozoneinfluss zeigte sich in den vorliegenden Untersuchungen eine zeitlich begrenzte Erhöhung der Aktivität: sowohl bei ‘Tenderette’ als auch bei ‘Oregon’. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Untersuchungen von Guri (1983) an *Phaseolus* und Castillo, Greppin (1988) an *Sedu*; sie stellten fest, dass die Aktivität dieses Enzyms nicht durch Ozon beeinflusst wird. Das Enzym Glutathionreduktase bestimmt die antioxidative Kapazität einer Pflanze über die Einstellung und Kontrolle des  $\text{Glutathion}_{\text{red}}/\text{Glutathion}_{\text{gesamt}}$ -Verhältnisses. Eine durch Ozon verursachte erhöhte Aktivität und einem damit erhöhten Umsatz von Glutathion (induziert durch ROS) kann eine verstärkte GSSG-Bildung in einem definierten Bereich kompensieren, was sich in einem konstanten  $\text{Glutathion}_{\text{red}}/\text{Glutathion}_{\text{gesamt}}$ -Verhältnis ausdrückt. Die Kontrolle des Redox-Status in den verschiedenen Zellkompartimenten ist für die Erhaltung zellulärer Strukturen und metabolischer Reaktionen bedeutend.

Der zeitliche Verlauf sowohl der Glutathionreduktase- als auch der Dehydroascorbatreduktase-Aktivität bei den Kontrollpflanzen entsprach dem, wie er bereits für Glucose-6-Phosphat beschrieben wurde. Eine durch Alterungsprozesse begründete Abnahme der Aktivitäten wurde auch bei Erbsen gefunden (Jiménez et al. 1998). Die Aktivitätsverminderung in *Phaseolus* auf 25 % (Dehydroascorbatreduktase) und 20 % (Glutathionreduktase) vollzog sich nicht kontinuierlich, sondern es trat im Bereich um 16 Tage eine Schwellenüberschreitung ein. Diese Regulierung der Glutathionreduktase-Aktivität auf ein niedrigeres Niveau konnte auch als Reflexion der (abnehmenden) Glutathion-Menge über die Zeit aufgefasst werden. Da auch die Dehydroascorbatreduktase Glutathion als Substrat verwendet, ist auch hier eine Anpassung durch eine Verminderung der Aktivitäten sinnvoll.

Aktivitäten von sog. **unspezifischen Peroxidasen** sind für alle Kompartimente beschrieben. Ihre Funktionen sind vielfältig, entsprechend den Metaboliten, die als Elektronen-Donatoren für das jeweilige Isoenzym zuständig sind (Ascorbat, Phenole, etc.). Bezüglich der Peroxidase-Aktivität zeigten die vorliegenden Ergebnisse, dass die Aktivitäten der Kontrollpflanzen der toleranten Varietät ‘Tenderette’ im Versuchszeitraum konstant waren, die der sensitiven Varietät jedoch deutliche Veränderungen zeigten. Die Entwicklungsmuster, die dieser Dynamik zugrunde lagen, konnten nicht ermittelt werden. Ozon verursachte bei beiden Varietäten einem Anstieg der Peroxidase-Aktivität; hierbei zeigte die sensitive Varietät ‘Oregon’ einen stärkeren Anstieg. Aber auch die tolerante Varietät ‘Tenderette’ wies unter Ozon höhere Aktivitätswerte auf.

Veränderte Peroxidase-Aktivitäten wurden bei verschiedenen Pflanzen unter verschiedenen Stressoren beobachtet (Ozon- und UV-Belastung auf *Arabidopsis*, Rao et al. 1996; Ozonbelastung auf *Pinus*, Alonso et al. 2001). Die Spezifizierung der gemessenen Aktivität auf ein Ereignis (hier Ozon) wurde aufgrund der verschiedenen Isoenzyme der Peroxidase schwierig, da ein Ausschluss anderer Reaktionen in komplexen Systemen nicht gelingen konnte. Auch Burkey et al. (2000) zeigten, dass im Vergleich verschiedener Genotypen von *Phaseolus* die ozonsensitiveren Varietäten den stärkeren Anstieg der Peroxidase-Aktivitäten aufwiesen. Auch für die vorliegenden Ergebnisse lies sich die Darstellungen von Burkey aufnehmen, dass die Peroxidase-Aktivität als früher und effektiver Indikator für Ozonstress bei Bohnen anzusehen war, aber nicht zwangsläufig

als Kriterium zur Unterscheidung sensitiver und toleranter Genotypen Anwendung finden konnte. Diop et al. (1997) gingen davon aus, dass Peroxidase-Aktivität als „sekundäre Konsequenz“ von ozoninduzierten Schäden anzusehen sind.

Die an *Phaseolus* gemessenen **Katalase**-Aktivitäten bestätigten die Beobachtung von Vanacker et al. (2000), dass sich eine Abhängigkeit von der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration zeigte. Unter der Annahme, dass die Ozonwirkung auch als ROS-Wirkung aufgefasst werden konnte (s.u.), ist bei der toleranten Varietät erst nach längerer Einwirkungszeit eine Verdopplung der Katalase-Aktivität (im Vergleich zu den Kontrollen) zu verzeichnen. Demgegenüber zeigte die sensitive Varietät ‘Oregon’ zunächst eine deutliche Aktivitätsminderung gefolgt von einer Zunahme der Aktivität, die jedoch im Vergleich zu ‘Tenderette’ geringer war. Ein Anstieg der Katalase-Aktivität nach Ozoneinwirkung wurde auch für *Pinus* (Alonso et al. 2001) beschrieben. Untersuchungen an Tabak zeigten, dass Katalase-Mangel-Mutanten unter Ozoneinfluss früher Schadbilder aufwiesen als die entsprechenden Kontrollpflanzen (Willekens et al. 1997). In der Diskussion über eine Parallele zwischen Pathogenabwehr und Ozondetoxifikation wurde vor allem auf eine Analogie der Katalase-Wirkung hingewiesen. Für andere Stressbedingungen wie im Bereich Thermotoleranz konnte eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Akkumulation beobachtet werden, gleichzeitig verminderten sich die Katalase-Aktivitäten (Dat et al. 1998). Es gibt eine Vielzahl von Beobachtungen über veränderte Aktivitäten von Katalase (und auch Superoxiddismutase) als Folge eines Hitzeschocks. Mit der Verminderung der antioxidativen Kapazität ging auch hier ein Anstieg der ROS-Konzentration einher (Dat et al. 1998).

Die vorliegenden Gesamtblattanalysen von *Phaseolus* bestätigten, dass das Ascorbat-Glutathion-System in die Detoxifizierungsprozesse von Ozon involviert war (Tab. 2). Die effektiven Veränderungen der einzelnen Komponenten waren, bezogen auf das Gesamtblattniveau, jedoch nicht sehr ausgeprägt und konnten für eine Interpretation unterschiedlicher Toleranzaussagen beider Bohnenvarietäten bezüglich Ozonwirkung nicht ausreichend sein. Aus diesem Grund sollen die Gesamtblattanalysen als Näherung gelten, die wertvolle Hinweise für weitere Untersuchungen darüber geben, „wo“ und „welche“ Einzelanalysen als sinnvolle und notwendige Ergänzung erfolgen müssen.

Die „Addition“ aller am Detoxifizierungsprozess beteiligter Bestandteile einer Zelle/eines Gewebes verstärkten die durch das Ascorbat-Glutathion-System bereits erkennbaren Tendenzen. Dazu konnte man (wie in Tab. 2 dargestellt) die einzelnen Komponenten „theoretisch“ addieren, aber auch sog. „Gesamtantioxidantienkapazitäten“ bezüglich der antioxidativen Wirkung bestimmen. Hierbei wurden jedoch Methoden-abhängig immer nur bestimmte mit dem gewählten Aufschlussmittel lösliche Bestandteile erfasst. Eine Auswahl zweier Aufschlussverfahren und damit der Einsatz zweier Antioxidantien-*assays* zeigte Varietätenunterschiede, die in der antioxidativen Kapazität zu suchen sind, deutlicher. Die Kinetik über die antioxidative Kapazität (ermittelt über den **NBT-assay**) zeigte eine Maximumskurve. Das Maximum wurde bei der toleranten Varietät ‘Tenderette’ zu einem deutlich früheren Zeitpunkt erreicht als bei der sensitiven ‘Oregon’. Auch die Amplitude dieses Maximums war größer.

Über ein zweites Aufschlussverfahren (**DPPH-assay**) wurde der Unterschied noch deutlicher. Die in diesem Verfahren erfassbaren Bestandteile waren anscheinend nur in der toleranten Varietät ‘Tenderette’ in nachweisbaren Mengen vorhanden und in der sensitiven ‘Oregon’ in diesem Bereich nicht bestimmbar. Beide Wege zeigten, dass sich der phänotypisch früh erkennbare Varietätenunterschied auch auf physiologischer Ebene fassen lässt.

Beeinflussung von Aktivitäten	Ascorbat-peroxidase	Dehydro-ascorbat-reduktase	Glutathion-reduktase	Katalase	Peroxidase	Glucose-6-Phosphat-Dehydrog.
‘Tenderette’	++	0	++	+	+	0
‘Oregon’	+	0	+	+	++	+/-

Beeinflussung von Mengen	Ascorbat	Glutathion	Reduktions-äquivalente	Glucose-6-Phosphat	Gesamt NBT	Gesamt DPPH
‘Tenderette’	0	+	0	-	++	++
‘Oregon’	0	0	0	-	+	-

Tab. 2: Zusammenfassende Darstellung der relativen Beeinflussung der einzelnen antioxidativ wirkenden Komponenten unter Ozoneinwirkung in den Gesamtblattanalysen. Bei der Betrachtung der einzelnen Komponenten waren teilweise nur Tendenzen zu erkennen. Aus der Addition dieser „Einzelwirkungen“ ergab sich ein Gesamtbild, das als Grundlage für die varietätenbedingten Unterschiede in Bezug auf Ozontoleranz/-sensitivität gelten konnte. In der Addition zeigte sich die deutlich stärkere Beeinflussung bei der toleranten Varietät ‘Tenderette’. 0 = unbeeinflusst; + = geringe Zunahme; ++ = deutliche Zunahme; - = Abnahme; +/- = zeitabhängig gegenläufige Reaktionen; NBT und DPPH siehe auch Kapitel 3.2.5

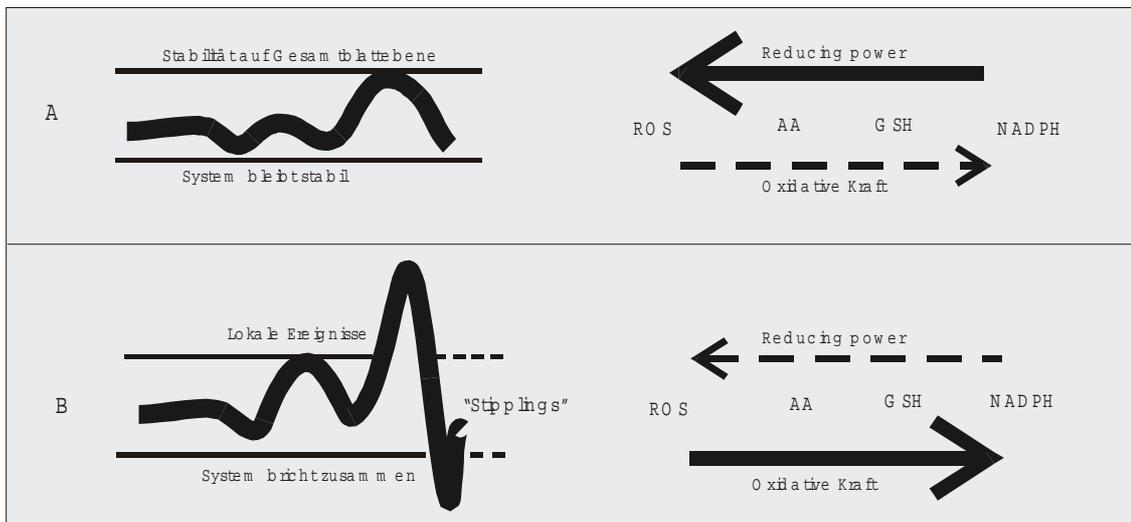


Abb. 58: Schematische Darstellung der „Schwankungen“ des Ascorbat-Glutathion-Systems nach Ozoneinwirkung. **A)** Gesamtblattebene: Das System reagierte, die „Schwankungen“ waren jedoch nicht sehr ausgeprägt. Die *reducing power* war stärker als die „oxidative Kraft“ der ROS. Die Einstellung eines neuen stabilen Status konnte erfolgen. Weitere Folgeerscheinungen waren nicht sehr ausgeprägt, da das System als Puffer gewirkt hatte und wenig Signalweiterleitung erfolgte. **B)** Lokale Erscheinungen, die bei ‘Oregon’ früher und bei ‘Tenderette’ später zu verzeichnen waren: Die Schwankungen des Systems wurden größer, das System war „überfordert“ und konnte nicht mehr gegensteuern. Die „oxidative Kraft“ der ROS war größer als die *reducing power*. Ein stabiler Zustand wurde nicht mehr erreicht, das System brach zusammen; phänotypisch wurden *stipplings* sichtbar.

Die Tatsache, dass die applizierten Ozonmengen das zelluläre antioxidative System (bezogen auf das Gesamtblatt) nicht wesentlich verändert hatten, zeigt die enorme Stabilität dieses Systems. Offensichtlich konnten lokale Zusammenbrüche (nur solche konnten ja zu den sichtbaren Ozonschäden in Form der *stiplings* führen) im Bereich des Gesamtorgans Blatt durch die „gesunden“, ungeschädigten Bereiche kompensiert werden (Abb. 58).

Die „Strategie“, stark geschädigte (nicht mehr zu „rettende“) Bereiche zugunsten des Überlebens des Gesamtorganismus zu „opfern“, ist eine unter dem Stichwort Apoptose bekannte erfolgreiche Strategie.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten nekrotischen Spots konnten als Bereiche eines programmierten Zelltodes definiert werden. Sie ermöglichten der sensitiven Varietät ‘Oregon’ ein - wenn auch zeitlich begrenztes - Überleben. Wie die Analysen zeigten, resultierte dieses Überleben in zellinternen Veränderungen, vor allem auf biochemischer Ebene. Und entsprechend den Verhältnissen bei der Pathogeninfektion und -abwehr (Vannacker et al. 1998B) ist auch bei „Ozonattacken“ (siehe auch unten) der Apoplast das primär betroffene Kompartiment. Im Apoplasten definierten sich die Varietätenunterschiede (bezogen auf eine unterschiedlich ausgeprägte Toleranz) beim untersuchten Ascorbat-Glutathion-System in nicht unerheblichem Maße in den Veränderungen der einzelnen Komponenten dieses Systems.

Apoptotische Ereignisse wurden ursprünglich für tierische Lebewesen definiert (Lam et al. 1999), fanden aber auch auf pflanzlichen Organismen Anwendung. In einer Vielzahl von physiologischen Prozessen ist ein kontrollierter Zelltod wichtig für die erfolgreiche (Weiter-) Entwicklung der Pflanze. Hier kann man neben Frucht- und Blattfall im Rahmen von Reifungs- und Seneszenzerscheinungen vor allem auch Pflanzen-Pathogen-Interaktionen und die daraus resultierende *hypersensitive response* (HR) nennen. Eine Reihe von Untersuchungen zeigten, dass der bei der HR auftretende Tod von Zellen einen programmierten Zelltod darstellte und als analoge Reaktion zum apoptotischen Zelltod bei Tieren anzusehen war (Lam et al. 1999). Die Initiierung dieses programmierten Zelltodes erfolgte als Reaktion auf die ROS. Die schädigende Wirkung des Ozons beruhte zu großen Teilen auf der Fähigkeit der Generierung von ROS (Pellinen et al. 1999; Rao et al. 2000). Untersuchungen zeigten, dass Ozon Signaltransduktionsketten in Gang setzte, ähnlich derer, die durch Pathogene induziert wurden. Ähnlichkeiten in den von Ozon und Pathogenen induzierten pflanzlichen Reaktionen lässt die Anwendung der Begriffe um den programmierten Zelltod fast zwangsläufig auch im Bereich von „Ozonattacken“ und der daraus resultierenden pflanzlichen Antwortreaktion zu (Sandermann 1998; Rao, Davis 1999). Es besteht die Möglichkeit, dass Cytochrom c eine Schlüsselfunktion in der Induktion von Apoptose innehat. Hierbei soll der Redox-Status ausschlaggebend sein. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang wieder die Rolle von Glutathion (reduzierte Form). Glutathion soll Cytochrom c in der reduzierten (inaktiven) Form stabilisieren und somit die Auslösung der Apoptose vermeiden. Die Anbindung zu dem untersuchten Ascorbat-Glutathion-System ist gegeben (Hancock et al. 2001). Auch hier könnte man somit vom kontrollierten Absterben von Zellbereichen nach Ozoneinwirkung ausgehen.

## 4.5 Analyse einzelner Kompartimente

### 4.5.1 Chloroplasten

Verschiedene Stressoren beeinflussten die einzelnen Zellkompartimenten in ganz unterschiedlichem Ausmaß, was sich unter anderem in den Reaktionen des antioxidativen Systems dieser Kompartimente widerspiegelte. Bei den an Chloroplasten durchgeführten Messungen wurden Ascorbat und Ascorbatperoxidase-Aktivitäten bestimmt, da diese die unmittelbaren Reaktionspartner der ROS darstellen. Das in Chloroplasten zu findende Ascorbat lag bei den vorliegenden Untersuchungen zu 95 % in der reduzierten Form vor. Untersuchungen an Spinatchloroplasten entsprachen mit ca. 96 % diesem Wert (Law et al. 1983). Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass nach Einwirkung von Ozon auf die Pflanzen die Ascorbat<sub>red</sub>/Ascorbat<sub>ox</sub>-Verhältnisse in den Chloroplasten unverändert bei 95 % blieben. Somit bestätigte sich, dass Ozon (bei den gewählten Verhältnissen) keinen unmittelbaren Einfluss auf die Redox-Verhältnisse im Chloroplasten hatte. Gleiches lies sich auch für die absoluten Ascorbatmengen (reduzierte und oxidierte Form) in den untersuchten Chloroplasten sagen. Auch hier war während bzw. nach Ozoneinwirkung keine messbare Veränderung der Ascorbatmengen zu verzeichnen. Die Mengen entsprachen denen der Kontrollpflanzen, d.h. eine Reaktion des Chloroplasten-Metabolismus (bezüglich des antioxidativen Systems) auf die Stresssituation bedingt durch Ozon fand demzufolge nicht statt. Diese Beobachtung wurde auch bei der Messung von Ascorbatperoxidase-Aktivitäten deutlich. Ozon hatte keinen Einfluss auf die Ascorbatperoxidase-Aktivitäten in den Chloroplasten der beiden untersuchten *Phaseolus*-Varietäten. Rao, Davis (1999) stellten bei ihren Untersuchungen fest, dass Ozon bei *Arabidopsis* eine rapide (70-80 %ige) Abnahme der Transkriptionslevel von Ascorbatperoxidase in Chloroplasten zur Folge hatte. Eine ergänzende Aktivitätsmessung des Enzyms lag nicht vor, so dass kein direkter Vergleich gezogen werden konnte. Eine Messung über die tatsächlich vorliegenden Aktivität (Halbwertszeit), die dann zugleich eine Aussage über die Effektivität in Bezug auf die Detoxifikation zulässt, scheint hier aussagekräftiger zu sein. Die Messung der Chloroplastenfraktion ergab, dass die Wirkung von - bzw. die Schädigung durch - Ozon an anderer Stelle erfolgen musste. Auch entsprechende Folgereaktionen waren offenbar nicht weitreichend genug, um Auswirkungen auf die Aktivitäten des antioxidativen Systems im Chloroplasten zu haben. „Stabile“ Entgiftungssysteme in anderen Zellkompartimenten sorgten nicht nur für eine Entgiftung des Ozons und seiner Folgeprodukte, sondern waren zugleich Puffersysteme, die eine Weiterleitung des Stresses verhinderten bzw. die Auswirkungen verminderten und somit tiefgreifende Schädigungen zu vermeiden halfen. Untersuchungen an Pappeln zeigten, dass eine transgene Variante die Glutathionreduktase in Chloroplasten und im Cytosol überexprimiert, bei Ozon-einwirkung keinerlei Vorteile gegenüber der Wildtyppflanze aufwies (Strohm et al. 1995). Auch in hier zeigte sich, dass der Chloroplast in Hinblick auf Ozon nicht das „Kompartiment der Wahl“ ist. Eine deutliche Aktivitätsänderung der chloroplastischen Ascorbatperoxidase konnte erst nach intensiven Lichteinstrahlungen beobachtet werden (Yoshimura et al. 2000). Unter derartigen Bedingungen war der Chloroplast das „entscheidende“ Kompartiment (Entgiftungssysteme anderer Kompartimente waren scheinbar nicht „vorgeschaltet“).

Die Untersuchungen an *Phaseolus* ergaben, dass der zeitliche Verlauf der Änderung der Ascorbatmengen, sowohl bei den Kontrollen als auch bei den behandelten Pflanzen dem

der Analysen der Gesamtblattextrakte gleich. Im Bereich von ca. 10 Tagen nach Start der Ozoneinwirkung zeigte sich ein (nicht ganz so deutlich ausgeprägter) Abfall der Ascorbatmenge. In diesem Bereich wurde eine Schwelle überschritten. Es war ein sprunghafter Abfall von einem zu Beginn höheren Niveau auf ein um 15 % niedrigeres Niveau zu verzeichnen. Wie bereits bei der Analyse der Gesamtascorbatmengen beobachtet werden konnte, zeigte sich auch hier, dass mit dem Erreichen eines neuen Entwicklungsstadiums ein neues stabiles Niveau eingestellt wurde.

#### **4.5.2 Apoplast**

Die Analyse der Funktionen des Apoplasten bei pflanzlichen Antwortreaktionen auf Umweltsignale erlangt zunehmendes Interesse (Hoson 1998, Sakurai, 1998). Immer deutlicher wird die Tatsache, dass der Apoplast als primäre Barriere bei der Ozondetoxifikation zu verstehen ist.

Die gewählte Methode zur Gewinnung des Apoplastenfluids aus Blattgewebe wurde in verschiedenen Veröffentlichungen als (relativ) „schnelle und einfache Methode zur Apoplastenfluidgewinnung“ bestätigt. Zudem repräsentierte das daraus gewonnene Apoplastenfluid bezüglich der physiologischen Zusammensetzung die Verhältnisse des extrazellulären Raums (Lohaus et al. 2000). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lohaus zeigte sich bei den vorliegenden Untersuchungen der Bohnenpflanzen, dass die Infiltrationszeit weniger Einfluss auf die „Qualität“ des Apoplastenfluids hatte als die verwendeten Zentrifugationsgeschwindigkeiten. Die von Lohaus ausgesprochene Empfehlung, Zeiträume unter 5 Min. zu wählen, konnte bei den Bohnen ohne Einbußen bis zur 4-fachen Zeit überschritten werden. Inwieweit dies mit einer konstanten (effektiveren?) Kühlung (von der bei Lohaus ausgegangen werden konnte, die jedoch nicht explizit genannt wurde) begründet werden kann oder in den Verhältnissen der gewählten Pflanzenart gesucht werden muss, kann nicht gesagt werden. Demgegenüber zeigten sich die Bohnen sensitiver gegenüber der Einwirkung der Zentrifugationskräfte. Geschwindigkeiten über 500 g führten zu deutlich stärkeren Kontaminationen des Apoplastenfluids mit interzellulären Molekülen (Kontrolle anhand von Messungen der Malatdehydrogenase-Aktivität). Die von Lohaus gezogene Grenze von 700 g musste deutlich unterschritten werden und wurde generell als zu hoch erachtet.

Unterstützt werden konnte die von Lohaus getroffene Einschätzung der Methode in Bezug auf ihre Vielfältigkeit der Anwendungsgebiete. Auch in den vorliegenden Untersuchungen konnten damit Abschätzungen für großflächige Bereiche vorgenommen werden. Punktuelle Detektionen oder gar zelluläre Eingrenzungen müssen auf anderen Wegen erfolgen.

#### **Radikale im Apoplasten**

Ozon dringt durch die Stomata in das Mesophyll der Blätter ein, die kutikuläre Permeation wird mit annähernd Null als unbedeutender Faktor nicht weiter in Betracht gezogen (Kerstiens, Lenzian 1989). Das Ozon diffundiert im inneren „Luftraum“ und erreicht die Zellwand und das Plasmalemma (Sharma, Davies 1997). Die Konzentration von Ozon im Zellinneren liegt nahe Null (Laisk et al. 1989). Es agiert und zerstört im Folgenden über die *reactive-oxygen-species* (ROS). Deren Entstehung ist durch Kontakt

mit wässrigem Milieu sowie Plasmalemma-Komponenten und auch zellulären Bestandteilen begünstigt (Pell et al. 1997; Mudd 1997).

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte im Apoplasten von *Phaseolus* das Vorhandensein von Radikalen bestätigt werden und ein direkter Zusammenhang zwischen Radikalmenge und dem Ozonereignis hergestellt werden.

Sowohl in der toleranten Varietät 'Tenderette' als auch in der sensitiven 'Oregon' akkumulierten durch Ozon Radikale im Apoplasten. Bei 'Tenderette' fiel diese Zunahme jedoch deutlich geringer aus als bei der sensitiven 'Oregon'. Auch hier war somit wieder ein deutlicher Varietätenunterschied erkennbar.

Bei der Betrachtung des Vorkommens von Radikalen im Apoplasten wurde die Problematik der zwei unterschiedlichen Seiten der ROS-Wirkung erkennbar. Grant, Loake (2000) fanden für die Rolle der ROS-Produktion die schöne Bezeichnung des „zweischneidigen Schwertes“. Neben dem schädigenden Einfluss muss auch die Signalwirkung, die von den ROS ausgeht, bedacht werden (ROS im Bereich Gravitropismus, Joo et al. 2001; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei der HR, Bolwell et al. 1999; ROS als Vermittler innerhalb der pflanzlichen Immunität, Sandermann 2000). Die genauen Regulationsvorgänge sind zumeist noch nicht geklärt. Nicht nur die Ergebnisse der Untersuchungen an *Phaseolus* lassen vermuten, dass die Menge der ROS in einem (pflanzen-spezifisch) genau definierten Bereich reguliert werden musste, um eine Signalwirkung auszuüben, ohne zytotoxische „Nebenwirkungen“ zu verursachen. Dies schien bei 'Tenderette' (zumindest im Anfangsbereich des Versuches) der Fall zu sein. Einem vorübergehend deutlicheren Anstieg von ROS im Apoplasten folgte eine Phase mit nur leicht erhöhten ROS-Mengen. Nach einem kurzen, deutlichen Signal folgte eine kontinuierlich leicht erhöhte „Signalstellung“ bei anhaltender Ozoneinwirkung. Beim Überschreiten einer (nicht näher bekannten) Schwelle kehrte die Situation ins Gegenteil um, die schädigende Wirkung überwog. Der Anstieg der ROS-Menge im Apoplasten fiel bei 'Oregon' noch deutlicher aus und auch in der Folgezeit blieben die Mengen deutlich über denen der Kontrollen und auch über denen von 'Tenderette' unter Ozoneinwirkung. Ein zuviel an ROS (bei 'Oregon') führte hier zu einer Umkehrung der Situation. Es erfolgte nicht die durch das Signal auszulösende Zunahme der Antioxidantien (wie bei 'Tenderette'), sondern eine Verminderung der Antioxidantien im Apoplasten (Abb. 60).

### **Antioxidantien im Apoplasten**

Apoplastische Ozondetoxifikation über die Aktion/Reaktion der Redoxpaare Ascorbat<sub>red</sub>/Ascorbat<sub>ox</sub> und/oder Glutathion<sub>red</sub>/Glutathion<sub>ox</sub> konnte in der vorliegenden Untersuchung an *Phaseolus* gezeigt werden. Damit bestätigten sich die Ergebnisse, die über Untersuchungen an Spinat und *Arabidopsis* vorlagen (Luwe et al. 1993; Conklin et al. 1996). Zugleich offenbarten sich darüber hinaus auch Anhaltspunkte zur unterschiedlichen Toleranz der beiden untersuchten *Phaseolus*-Varietäten.

Die Antioxidantien im Apoplasten agieren und reagieren in einer Vielzahl von Phänomenen sowohl bei Wachstumsvorgängen als auch im Rahmen von Abwehrreaktionen (Córdoba, González-Reyes 1994; Vanacker et al. 1998a+b; Kato, Esaka 1999; Veljovic-Jovanovic et al. 2001). Von besonderer Bedeutung ist auch hier das Ascorbat. Im Bereich der Zellwandbildung ist es ebenso von Bedeutung wie bei Detoxifikationsreaktionen.

In der vorliegenden Versuchen führte Ozon bei der toleranten Varietät 'Tenderette' zu einer deutlichen Zunahme der **Gesamtascorbatmenge** im Apoplasten. Eine Beobachtung, die auch für *Sedum* gemacht wurde. Behandlung mit verschiedenen Ozonkonzentrationen führte hier immer zu einem Anstieg der Gesamtascorbatmenge im Apoplasten (Castillo, Greppin 1988). Da bei den vorliegenden Analysen am Gesamtblatt keine Zunahme der Gesamtascorbatmenge verzeichnet werden konnte, bedeutet dies, dass Ozoneinwirkung in einer Verschiebung des Ascorbats zwischen den Kompartimenten resultierte. Die Varietät 'Tenderette' transportierte deutlich mehr Ascorbat in den Apoplasten, um dort eine verstärkte Ozondetoxifikation durchführen zu können. Ausgehend von einer direkten Reaktion des reduzierten Ascorbats mit Ozon zeigten sich auch in der Betrachtung der Verhältnisse von  $\text{Ascorbat}_{\text{red}}/\text{Ascorbat}_{\text{ox}}$  immer wieder tendenzielle Verschiebungen in Richtung der oxidierten Form. Aber unter den gegebenen Bedingungen schienen die Regenerationssysteme in ausreichender Quantität und Qualität wirksam zu sein. Das Verhältnis blieb im großen und ganzen erhalten. Die zumindest zeitweise vorhandene Effektivität der Ozondetoxifikation durch Ascorbat zeigte sich im verzögerten Auftreten von Ozonschäden bei der toleranten Varietät 'Tenderette' bei gleichzeitiger Erhöhung der Ascorbatkonzentration im Apoplasten. Bei der sensitiven Varietät hingegen zeigte sich die umgekehrte Reaktion. Ozon führte hier zu einer deutlichen Verminderung der Ascorbatkonzentration im Apoplasten bei den begasten Pflanzen. (Die Kontrollen wiesen im Vergleich untereinander kaum Unterschiede in den Ascorbatmengen auf.) Da auch bei 'Oregon' auf Gesamtblattebene keine derartig deutliche Veränderung der Ascorbatmengen nach Ozon zu erkennen war, lag die Ursache vermutlich ebenfalls in einer geänderten (hier verminderten) Transportfähigkeit (Abb. 59). Studien zeigten den Einfluss von Ozon auf Membranproteine und hier auch auf Transportproteine (Tokarska-Schlattner et al. 1997). Das Vorhandensein von Transportern in der Plasmamembran wird noch kontrovers diskutiert (Horemans et al. 1996+1997; Smirnov 2000; Bichele et al. 2000). Es erscheint aber sehr wahrscheinlich, dass der Ascorbattransport über spezielle Carrier erfolgt (Horemans et al. 2000). Das Fehlen einer sehr wichtigen Detoxifikationskomponente im Apoplasten von 'Oregon' war phänotypisch sichtbar mit dem Auftreten von *stiplings* korreliert. Dies geschah zudem zu einem deutlich früheren Zeitpunkt als bei der toleranten Varietät 'Tenderette'. Dieser deutliche Unterschied der Ascorbatmengen im Apoplasten der beiden Varietäten spiegelte sich auch in deutlich unterschiedlichen Graden an Toleranz gegenüber Ozon wider. Dies ist nicht immer mit dieser Eindeutigkeit der Fall. Untersuchungen an Pappeln zeigten, dass die Ozondetoxifikation durch Ascorbat hier nicht für Erklärungen der unterschiedlichen Ozontoleranz zweier verschiedener Klone herangezogen werden konnte (Ranieri et al. 1999).

Moldau (1999) war generell der Ansicht, dass Ascorbat in der Zellwand nicht als perfekte Barriere gegen Ozon angesehen werden kann. Dem konnte nach Vorlage der Untersuchungen an *Phaseolus* teilweise zugestimmt werden. Die Untersuchungen ergaben eine Zeitabhängigkeit der Ascorbateffektivität. Bei 'Tenderette' konnte Ascorbat deutlich länger als bei 'Oregon' eine erfolgreiche Entgiftung durchführen. Die tatsächliche Menge von Ozon, die über Ascorbat im Apoplasten detoxifiziert wurden, ist weitgehend spekulativ. Untersuchungen an Spinat ergaben, dass „nur“ 5 – 10 % des Ozons über Ascorbat entgiftet wurden (Luwe et al. 1993). Demgegenüber standen Angaben über Ozon-Detoxifikationsraten von 50 – 70 % (Moldau 1998).

Jakob und Heber (1998) stellten fest, dass apoplastisches Ascorbat nicht effektiv genug war, um Schädigungen der Blätter durch Ozon vollständig zu verhindern. Auch hier wurde auf die bereits angesprochene Problematik der punktuellen Lokalisation nicht nur

von Ascorbat im Apoplasten hingewiesen. Die Ergebnisse der Messungen stellten eine Zusammenfassung des gesamten apoplastischen Bereichs eines größeren Blattbereiches dar (Jakob, Heber 1998). Lokale Schwankungen der Ascorbatkonzentration (u.a. bedingt durch lokale Schwankungen der Ozonkonzentration durch ein verändertes Stomaverhalten) können – neben der Tatsache, dass Ascorbat „nur“ Teile des Ozons detoxifizieren konnte – Erklärung für das Auftreten von Schäden sein.

Bei den Untersuchungen an *Phaseolus* konnte - im Gegensatz zu anderen Pflanzen (u.a. Spinat – Luwe et al. 1993; Kürbis – Ranieri et al. 1996) - nachgewiesen werden, dass neben Ascorbat auch **Glutathion** am Detoxifizierungsprozess im Apoplasten beteiligt war. Hierbei zeigte sich bei den Messergebnissen eine deutliche Parallele zu denen des Ascorbats. Bei der toleranten Varietät 'Tenderette' konnte unter Ozon im Apoplasten deutlich mehr Gesamtglutathion gemessen werden als in den Apoplastenfluids der Kontrollpflanzen. Und entsprechend gegensätzliche Verhältnisse lagen bei der sensitiven Varietät 'Oregon' vor. Hier zeigten sich unter Ozoneinfluss im Apoplasten geringere Glutathionmengen als bei den Kontrollen. Die Glutathionmengen im Apoplasten durchliefen während des Versuchszeitraumes abwechselnd Maxima und Minima. Die Ozoneinwirkung schien die Transportraten bei 'Tenderette' zu verstärken und umgekehrt bei 'Oregon' zu hemmen (Abb. 59).

Die Verhältnisse  $\text{Glutathion}_{\text{red}}/\text{Glutathion}_{\text{ox}}$ , die in den Kontrollpflanzen zwischen 50-60 % lagen, sanken unter Ozoneinwirkung ab. Der Anteil von oxidiertem Glutathion nahm zu. Auch für Glutathion war das Vorhandensein von Transportern aufgrund der mit Ozoneinwirkung eng korrelierten (verhältnismäßig schnellen) Abnahme der Glutathionmengen (Regulation?) zu postulieren.

Eine Zunahme von Glutathion war nicht nur bei der direkten antioxidativen Wirkung des Moleküls von Bedeutung. Zusätzliche Glutathionmengen stabilisierten zudem den Redox-Status im Apoplasten (analog zu Beschreibungen von Schraudner et al. 1997 im Chloroplasten) während des *scavengings* der vermehrt auftretenden ROS. Mit dem Verlust von Glutathion im Apoplasten von *Phaseolus* (gestörte Signalwirkung der ROS, s.o.) ging der Verlust korrelierter Funktionen einher. Dies bedeutete im Varietätenvergleich, dass die sensitive 'Oregon' somit einen deutlichen Nachteil gegenüber der toleranten 'Tenderette' hatte. Die Tatsache, dass Glutathion-Null-Mutationen letal waren (Xiang et al. 2001) machte zusammen mit den Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit deutlich, wie einschneidend die drastischen Verminderungen der Glutathionmenge für die Pflanze waren.

Als Folge der geänderten Transportraten (Abb. 59) ergaben sich verschiedene Ascorbat- und Glutathionmengen in den Apoplasten der behandelten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen. Abbildung 60 verdeutlicht das Ergebnis dieser geänderter Transportraten und deren Folgen der geänderten Antioxidantienmengen anhand einer schematischen Darstellung. Diese veränderten Antioxidantienmengen könnten im Fall von 'Oregon' als Ergebnis der „gestörten“ Signalwirkung der durch Ozon induzierten ROS interpretiert werden.

Jedes Antioxidans kann für sich alleine eine Schutzfunktion vor bzw. gegen Schäden, verursacht durch oxidativen Stress, innehaben. Im vorliegenden Fall war eine additive Wirkung beider Antioxidantien bei den *Phaseolus*-Pflanzen zu verzeichnen. Bei der toleranten Varietät 'Tenderette' ergab sich eine gesteigerte Schutzfunktion und im Vergleich dazu – durch das Fehlen beider Antioxidantien bei der sensitiven Varietät – ein deutlich verminderter Schutz (sichtbar durch frühere Schäden). Eine solche Schutzwirkung durch additive Kombination beider Antioxidantien zeigte sich auch in anderen Studien, u.a. an Tabak (Wellburn, Wellburn 1996).

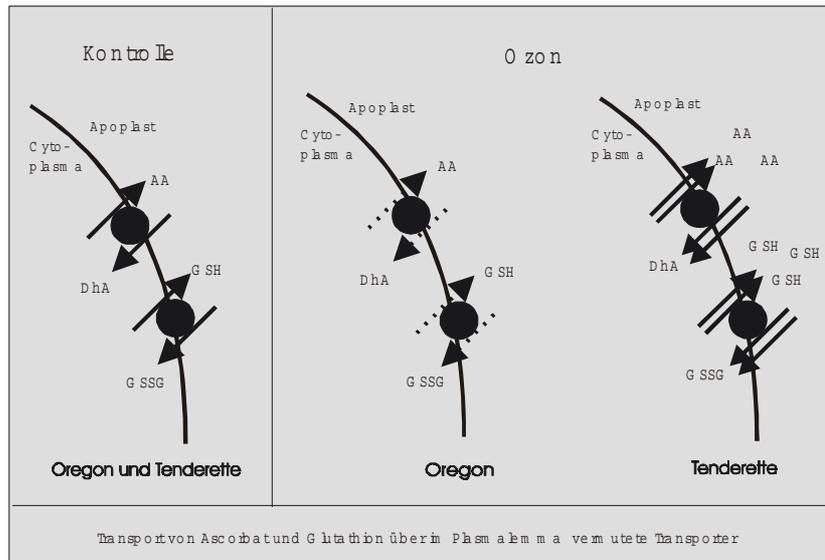


Abb. 59: Einfluss von Ozon auf die Transportraten von Ascorbat und Glutathion bei beiden *Phaseolus*-Varietäten. 'Oregon' wies im Vergleich zu den Kontrollen verminderte Gehalte von Gesamtascorbat und -glutathion auf. Hier schien das Ozon zu einer Hemmung der Transportraten geführt zu haben (unterbrochene Pfeile). Im Gegensatz dazu zeigten sich sowohl Gesamtascorbat- als auch -glutathionmengen nach Ozoneinwirkung im Apoplasten von 'Tenderette' deutlich erhöht. Eine gesteigerte Transportrate der Moleküle könnte hierfür ausschlaggebend sein (Doppelpfeile).

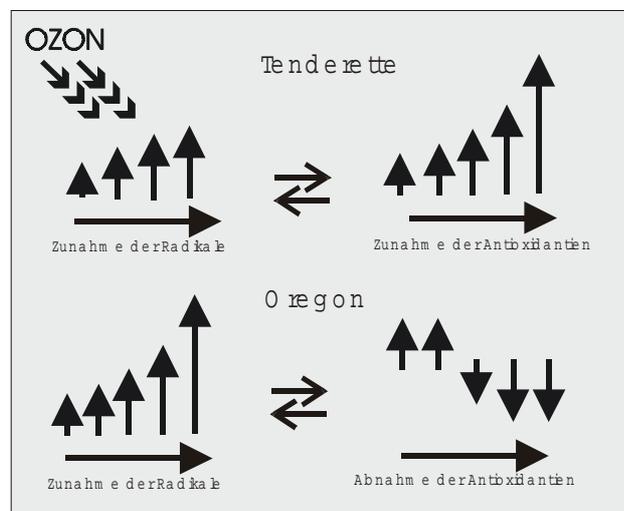


Abb. 60: Darstellung der Verhältnisse im Apoplasten von *Phaseolus vulgaris* 'Tenderette' und 'Oregon' nach Ozoneinwirkung (Radikale siehe auch 3.6; Antioxidantien hier: Ascorbat und Glutathion). Der kontinuierlichen leichten Zunahme der Radikale im Apoplasten von 'Tenderette' stand eine sprunghafte Zunahme der Antioxidantien gegenüber. Die Signalwirkung der ROS überwog. Die Antioxidantien konnten einer Schädigung effizient entgegenwirken. Bei 'Oregon' war eine sprunghafte Zunahme von Radikalen zu verzeichnen. Die gleichzeitige deutliche Verminderung der Antioxidantien im Apoplasten hatte auf phänotypischer Ebene das Auftreten der charakteristischen Ozonschäden in Form von *stiplings* zur Folge.

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, dass neben den sog. unspezifischen Peroxidasen- (Guajacol-abhängige Peroxidasen), Ascorbatperoxidase- und Glutathionreduktase-Aktivitäten im Apoplasten messbar sind.

Die **Ascorbatperoxidase**-Aktivitäten waren durch Ozon beeinflussbar. Die tolerante Varietät 'Tenderette' wies unter Stressbedingungen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen höhere Ascorbatperoxidase-Aktivitäten auf. Zusammen mit der erhöhten Ascorbatmenge erreichten sie eine effizientere ROS-Entgiftung im Apoplasten, was sich phänotypisch in dem sehr viel späteren Eintreten von Schadbildern manifestierte. Im Gegensatz dazu zeigte 'Oregon' nach einem anfänglichen Anstieg der Ascorbatperoxidase-Aktivität unter Ozon im weiteren Verlauf eine Abnahme der Aktivität, die gegen Ende sogar unter die Werte der Kontrollpflanzen fiel. Entsprechend den Untersuchungen von Nakano, Asada (1987) lies sich dies mit der niedrigeren Ascorbatmenge im Apoplasten bei 'Oregon' nach Ozoneinwirkung erklären. Die von Nakano, Asada (1987) beobachtete Inaktivierung von Ascorbatperoxidase im Chloroplasten bei Fehlen ausreichender Mengen an Ascorbat traf somit auch für den Apoplasten zu. (Eine Beobachtung, die auch bei Untersuchungen zur Optimierung der Methode an *Phaseolus* gemacht wurde. Ein Fehlen von Ascorbat bei der Isolierung des Apoplastenfluids hatte *in vitro* deutliche Aktivitätsverluste dieses Enzyms zur Folge. Ergebnisse nicht gezeigt). Dies schien unter Berücksichtigung der Erkenntnisse des Verhaltens in Chloroplasten auch auf die *in vivo* Verhältnisse im Apoplasten übertragbar zu sein.

Ein „negatives“ Ergebnis war für die **Dehydroascorbatreduktase** zu verzeichnen. In *Phaseolus* konnte keine Aktivität dieses Enzyms im Apoplasten gemessen werden. Dies deutete in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Luwe, Heber (1995) und Luwe et al. (1993) darauf hin, dass im Apoplasten keine Reduktion von Dehydroascorbat über das Ascorbat-Glutathion-System durch die katalysierende Reaktion der Dehydroascorbatreduktase stattfand. Ob dies bedeutete, dass die oxidierte Form des Moleküls zur Reduktion in das Zellinnere transportiert wurde (Potters et al. 2000, Horemans et al. 2000) oder andere Reduktionsreaktionen abliefen, konnte nicht entschieden werden. Das Vorkommen von Dehydroascorbatreduktase wird in der Literatur kontrovers beschrieben. Vannacker et al. (1998b) konnten in Apoplasten von Hafer Dehydroascorbatreduktase-Aktivitäten messen. Für *Sedum* (Castillo, Greppin 1988) und Spinat (Luwe et al. 1993) war entsprechend den Untersuchungen an *Phaseolus* keine Dehydroascorbatreduktase-Aktivität nachweisbar. Es wurde diskutiert, ob andere Proteine die Funktion der Dehydroascorbatreduktase übernehmen (Morel et al. 1997, Foyer, Mullineaux 1998). Dem Thioredoxin wurde Dehydroascorbatreduktase-Aktivität nachgesagt (Morel et al. 1997, Arnér, Holmgren 2000). Zugleich bezweifelten Morel et al. (1997) in ihrer Studie, dass Pflanzen eine spezifische Dehydroascorbatreduktase besitzen. Eine Dehydroascorbatreduktase-Aktivität sei als Nebenreaktion von (u.a.) Thioredoxin zu verstehen. Eine Aussage, die bislang keine weitere Bestätigung erfahren hat. Eine weitere These besagt, dass Glutathion in der Lage sein könnte, Dehydroascorbat direkt zu reduzieren (DePinto, DeGara 1999). Eine geringere Glutathionmenge, wie es bei der sensitiven Varietät 'Oregon' der Fall war, würde somit eine „doppelte“ Belastung für das Entgiftungssystem bedeuten.

Für eine erfolgreiche Reduktion über das Ascorbat-Glutathion-System müsste das Fehlen von NADPH im Apoplasten von *Phaseolus* in anderer Weise ausgeglichen werden. Ein Kandidat hierfür könnte Coenzym Q<sub>6</sub> sein. Für Hefen konnte das Membranprotein im Elektronen-Transport-System zur Reduktion von Ascorbat im Apoplasten

identifiziert werden (Santos-Ocana et al. 1998). Durch Ozon hervorgerufenen Schäden sind primär in Membranen zu finden, womit auch dieses Enzym von Ausfallerscheinungen bereits früh betroffen sein müsste, und somit auch eine Reduktion im Apoplasten zum Stillstand kommt (entsprechend evt. Schäden an Transportern durch Ozon).

In *Phaseolus* konnte **Glutathionreduktase**-Aktivität im Apoplasten nachgewiesen werden. Die Aktivität des Enzyms ist durch Ozon beeinflussbar. Die Behandlung resultierte bei beiden Varietäten in einem Anstieg der Aktivitäten. Einen Varietäten-spezifischen Unterschied konnte man jedoch nicht erkennen.

Das Ascorbat-Glutathion-System ist nur eine Komponente der pflanzlichen Entgiftungsreaktionen. In *Phaseolus* waren unter Ozoneinwirkung weitere Detoxifikationsmechanismen aktiv. Die vorliegenden Messungen ergaben eine deutlich negative Korrelation zwischen dem Toleranzgrad gegen Ozon und der Peroxidase-Aktivität (sog. **unspezifische (Guajacol-abhängige) Peroxidasen**). Maximale Peroxidase-Aktivitäten zeigten sich unter Ozoneinwirkung bei der sensitiven Varietät 'Oregon'. Auch Burkey et al. (2000) fanden in ihren Untersuchungen einen Anstieg der Peroxidase-Aktivität als Reaktion auf Ozon. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Untersuchungen waren es auch dort die ozonsensitiveren Genotypen, die den stärksten Anstieg der Aktivitäten aufwies. Diop et al. (1997) konnten auch für *Phaseolus* (hier zwei andere Genotypen) feststellen, dass die sensitivere Pflanze schneller und intensiver auf Ozon reagierte. Dessen ungeachtet wiesen sie darauf hin, dass die Verwendung der Peroxidase-Aktivität als quantitativer Marker bei Ozoneinfluss nur begrenzt möglich sei, da eine Überlagerung mit anderen Umweltfaktoren gerade bei sog. unspezifischen Peroxidasen ausgeprägt ist.

Literaturangaben über das Vorhandensein verschiedener weiterer antioxidativen Enzyme im Apoplasten sind widersprüchlich.

Extrazelluläre Peroxidase-Aktivität wurde sowohl bei der Detoxifizierung von Ozon bei *Sedum album* L. (Penel, Castillo (1989) als auch allgemein im Lignifizierungsprozess (Takahama, Oniki 1992) diskutiert. Peroxidase- und Ascorbatperoxidase-Aktivitäten im Apoplasten und deren Beeinflussung durch Ozon war auch an anderer Stelle für Bohnen gezeigt worden (Moldau et al. 1997). Nach Virusinfektion wurde in Apoplasten von resistenten Aprikosenvarianten ein Anstieg von Katalase-, Superoxiddismutase- und Dehydroascorbatreduktase-Aktivität verzeichnet (Hernández et al. 2001a). Das Zusammenspiel von Katalase, Ascorbatperoxidase, Glutathionreduktase, Dehydroascorbatreduktase und Superoxiddismutase wurde auch in Apoplasten von Hafer beschrieben (Vanacker et al. 1998b). Entgegengesetzt waren die Ergebnisse von Fichten-Apoplastenfluids. Hier konnten Peroxidasen- und Katalase-Aktivität im Apoplasten gemessen werden, aber keine Aktivitäten von Ascorbatperoxidase, Dehydroascorbatreduktase und Glutathionreduktase (Polle et al. 1990). Ähnlich konnten die Ergebnisse an Erbsen interpretiert werden. Superoxiddismutase- und Dehydroascorbatreduktase-Aktivitäten sind im Apoplasten nachweisbar, das Vorkommen von Ascorbatperoxidase- und Glutathionreduktase-Aktivitäten wurde verneint (Hernandez et al. 2001b).

#### 4.6 Vergleich Gesamtblattextrakt und Apoplastenfluid

		Ascorbat	Glutathion	Ascorbat- peroxidase	Dehydro- ascorbat- reduktase	Glutathion- reduktase
'Tenderette'	Gesamt- blatt	0	↑	↑↑	0	↑↑
	Apoplast	↑↑	↑↑	↑↑	□	↑↑
'Oregon'	Gesamt- blatt	0	0	↑	0	↑
	Apoplast	↓	↓	↑	□	↑↑

Tab. 3: Vergleich der Messungen von Gesamtblattextrakten und Apoplastenfluids am Beispiel der Komponenten des Ascorbat-Glutathion-Systems unter Ozon-einwirkung. Ozon führte im Apoplasten zu deutlicheren Veränderungen, die bei Untersuchungen der Gesamtblattsituation häufig kompensiert wurden. Die Veränderungen waren bei der toleranten Varietät 'Tenderette' stärker ausgeprägt als bei der sensitiven 'Oregon'. ↑ = Zunahme; ↓ = Abnahme; 0 = unbeeinflusst; □ = nicht nachweisbar.

Aus der in Tab. 3 dargestellten Zusammenfassung der Reaktionen innerhalb des Ascorbat-Glutathion-Systems (Enzyme und Metaboliten), sowohl auf Gesamtblattebene als auch spezifisch im Apoplasten, wurde eines ganz besonders deutlich: Die Fähigkeit einer Pflanze die Folgeprodukte von Ozonattacken zu entgiften hing in erster Linie davon ab, wie die Koordination aller am Entgiftungsgeschehen beteiligten Komponenten innerhalb der Zelle und über deren Grenzen (Membranen) hinaus „organisiert“ wurde. Der Prozess einer Abwehrreaktion musste sowohl zeitlich als auch räumlich koordiniert werden, um sicherzustellen, dass nur die tatsächlich notwendige Anzahl von Pflanzenzellen vom „normalen“ Metabolismus zur Anschaltung von antioxidativen Reaktionen überging. Nicht nur in diesem Zusammenhang bestätigte sich, dass eine subzelluläre Kompartimentierung des antioxidativen Systems für eine erfolgreiche Abwehrstrategie gegen extern sowie auch intern induzierte und generierte ROS von Bedeutung ist. Deutlich zeigte sich im Vergleich der „veränderten“ Komponenten des Ascorbat-Glutathion-Systems von Apoplastenfluid und Gesamtblattextrakten, dass im Apoplasten eine positive Korrelation zwischen Ozonereignis und Metabolitenmengen bzw. Enzymaktivitäten zu erkennen war. Hierbei wurde der Varietätenunterschied, der sich phänotypisch in einer zeitlich verschobenen Ausbildung von Schäden zeigte, biochemisch vor allem im Apoplasten sichtbar. Das mehr oder weniger vollständige Verschwinden von den zur Detoxifikation notwendigen Metaboliten (Ascorbat und Glutathion) im Apoplasten von 'Oregon' zeigte sich in Übereinstimmung mit der größeren Sensitivität dieser Varietät gegenüber Ozon. Die primäre „Aktion“ von Ozon und die daraus resultierende „Reaktion“ der *Phaseolus*-Pflanzen fand im Apoplasten statt, eine „Weiterleitung“ dieser Aktion bzw. der „Befehl“ zur Reaktion (Signalwirkungen) erfolgte nur in begrenztem Maße. Die besondere Bedeutung, die der Apoplast im antioxidativen Geschehen im Rahmen der Ozondetoxifikation hatte, war nicht nur durch die

verbindende Rolle der Kommunikation von Zelle zu Zelle erkennbar. Auch in der Rolle als primäre Barriere gegen Umwelteinflüsse erfüllte er eine doppelte Funktion. Auf die Aktionen der Umwelt vermochte er zu reagieren (u.a. mit dem antioxidativen Ascorbat-Glutathion-System), und darüber hinaus vermittelte und modulierte er die Aktionen in das Innere der Zelle. Diese so durch den Apoplasten vermittelten Informationen waren ausschlaggebend für die weiteren Folgereaktionen. Die Perzeption, die Verarbeitung und die Modulierung von Signalen und schließlich deren Übermittlung sowohl vom Apoplasten ins Zellinnere als auch in weiterleitende Zellen und Gewebe geben Raum für weitere Forschungsvorhaben.

## 5 Zusammenfassung

Ozon bewirkte bei *Phaseolus*-Pflanzen das verfrühte Auftreten von Seneszenzerscheinungen wie Vergilbung der Blätter, Turgeszenzverlust und schließlich Blattabwurf. Auf physiologischer Ebene war unter Ozoneinwirkung ein stärkerer Verlust an Photosynthesepigmenten zu erkennen. Phänotypisch traten charakteristische Ozonschäden in Form von *stiplings* (rötlichbraune tüpfelförmige Läsionen) auf. Die sensitive Varietät 'Oregon' zeigte dies deutlich früher als die tolerante Varietät 'Tenderette'.

Das Ascorbat-Glutathion-System war im Rahmen der Abwehrreaktionen von *Phaseolus* bei Ozoneinwirkung aktiv. Ozon bewirkte eine Zunahme an Mengen (Glutathion) bzw. Aktivitäten (Ascorbatreduktase, Glutathionreduktase, Peroxidase) der einzelnen Komponenten des Systems. Zudem zeigten sich Verschiebungen der Fraktion des reduzierten Ascorbats.

Die Metaboliten Glutathion und Glucose-6-Phosphat bzw. die Aktivitäten von Dehydroascorbatreduktase und Glutathionreduktase zeigten ein charakteristisches Verlaufsmuster. Über einen definierten Zeitraum waren die Mengen der Metaboliten bzw. die Enzymaktivitäten konstant (stabil). Nach dem Überschreiten einer Schwelle stellte sich im weiteren Verlauf ein neues ebenfalls stabiles Niveau ein. Ozon bewirkte bei Glucose-6-Phosphat eine Verlängerung des ersten Niveaus, d.h. eine Verzögerung der Schwellenüberschreitung und der Neuorientierung in einem neuen Niveau.

Parallel dazu zeigten sich im Ascorbat-Glutathion-System stabile und plastische Komponenten, die in gegenseitiger Ergänzung zur Aufrechterhaltung physiologischer Prozesse beitrugen. Labile Ereignisse, d.h. der Zusammenbruch des Systems unter Ozoneinwirkung war nur lokal zu beobachten und resultierte in den sog. *stiplings*.

Die einzelnen Kompartimente waren mit unterschiedlichem Ausmaß am Ozongeschehen beteiligt. Auf den chloroplastischen Metabolismus zeigte Ozon (in Bezug auf die untersuchten Komponenten des Ascorbat-Glutathion-Systems) keinen Einfluss. Deutliche und vor allem unterschiedliche (Varietäten-abhängige) Reaktionen waren im Apoplasten zu verzeichnen. Ozon bewirkte eine Zunahme der Metaboliten Ascorbat und Glutathion im Apoplasten der toleranten Varietät 'Tenderette'. Dem stand eine Verminderung der Metaboliten in diesem Kompartiment bei der sensitiven 'Oregon' gegenüber. Weitere Anstiege durch Ozon zeigten sich bei der Ascorbatperoxidase-Aktivität (höher bei 'Tenderette'), der Glutathionreduktase-Aktivität (beide Varietäten) und der Peroxidase-Aktivität (höher bei 'Oregon').

Die Reaktionen im Apoplasten (bezüglich des Ascorbat-Glutathion-Systems) waren an der Ausbildung der unterschiedlichen Grade von Toleranz der beiden Varietäten beteiligt. Sie stellten einen wichtigen Bestandteil der antioxidativen Kapazität dar. Messungen der Gesamtantioxidantienkapazität ergaben ebenfalls deutliche Varietäten-abhängige Unterschiede. Größere bzw. früher verfügbare Kapazitäten waren bei der toleranten Varietät messbar.

Radikaldetektionen im Apoplasten zeigten, dass nach Ozon eine deutliche Akkumulation von Radikalen in diesem Kompartiment festgestellt werden konnten. Der Vergleich von Radikalakkumulation und Antioxidantienmengen zeigte, dass bei der toleranten 'Tenderette' einer kontinuierlich leichten Zunahme der Radikale ein exponentieller Anstieg der Antioxidantien Ascorbat und Glutathion gegenüberstand. Bei der sensitiven 'Oregon' war hingegen eine exponentielle Zunahme an Radikalen und gleichzeitig eine Abnahme der Antioxidantien im Apoplasten zu verzeichnen.

## 6 Literaturverzeichnis

- **Aebi H (1984)** Catalase. Meth Enzym 105, 121-126
- **Alonso R, Elvira S, Castillo FJ, Gimeno BS (1999)** Antioxidative defence and photoprotection in *Pinus halpensis* induced by mediteranean conditions and ozone treatment. Free Radic Res 31, 59-65
- **Alonso R, Elvira S, Castillo FJ, Gimeno BS (2001)** Interactive effects of ozone and drought stress on pigments and activities of antioxidative enzymes in *Pinus halpensis*. Plant Cell Environ 24, 905-916
- **Alscher RG (1989)** Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. Physiol Plant 77, 457-464
- **Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL (1997)** Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. Physiol Plant 100, 224-233
- **Anderson ME (1985)** Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. Meth Enzym 113, 548-555
- **Anderson JW, Foyer CH, Walker DA (1983)** Light-dependent reduction of dehydroascorbate and uptake of exogenous ascorbate by spinach chloroplasts. Planta 158, 442-450
- **Arnér ESJ, Holmgren A (2000)** Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Europ J Biochem 267, 6102-6109
- **Arora R, Pitchay DS, Bearce BC (1998)** Water-stress-induced heat tolerance in geranium leaf tissue: A possible linkage through stress proteins? Physiol Plant 103, 24-34
- **Asada K (1992)** Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiol Plant 85, 235-241
- **Baginsky S, Tiller K, Pfannschmidt T, Link G (1999)** PTK, the chloroplast RNA polymerase-associated protein kinase from mustard (*Sinapis alba*), mediates redox control of plastid *in vitro* transcription. Plant Mol Biol 39, 1013-1023
- **Balavoine GGA, Geletii YV (1999)** Peroxynitrit scavenging by different antioxidants, Part I: Convenient assay; Nitric Oxide. Biol Chem 3, 40-54
- **Bergmeyer, Brent (1983)** Malatdehydrogenase. In: Meth Enzym Anal 3, Bergmeyer HU (ed.) Verlag Chemie Weinheim, 171-175
- **Bichele I, Moldau H, Padu E (2000)** Estimation of plasmalemma conductivity to ascorbic acid in intact leaves exposed to ozone. Physiol Plant 108, 405-412
- **Bijur GN, Briggs B, Hitchcock CL, Williams MV (1999)** Ascorbic acid-dehydroascorbate induces cell cycle arrest at G2/M DNA damage checkpoint during oxidative stress. Environ Mol Mutagen 33, 144-152
- **Bittner M, Dech S, Balzer W (1998)** Ozonkartierung per Satellit. Spektr Wiss 9, 54-61
- **Böhler S** Kritisch-Punkt-Trocknung biologischer Proben in der Raster-elektronenmikroskopie; Fachbericht BALTEC EM-Technologie und Applikation BU 800108DD8712
- **Bolwell GP (1996)** The origin of the oxidative burst in plants. Biochem Soc Trans 24, 438-442

- **Bolwell GP, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F, Rowntree EG, Wojtaszek P (1999)** Recent advances in understanding the origin of the apoplastic oxidative burst in plant cells. *Free Radic Res* 31, 137-145
- **Bowler C, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D (1994)** Superoxide dismutase in plants. *Crit Rev Plant Sci* 13, 199-218
- **Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-258
- **Brunold C, Rügsegger A, Brändle R (eds.) 1996** Stress bei Pflanzen. UTB, Bern, Stuttgart, Wien
- **Burdon RH, O'Kane D, Fadzillah N, Gill V, Boyd PA, Finch RR (1996)** Oxidative stress and responses in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* subjected to chilling and salinity. *Biochem Soc Trans Free Rad Proc Plants* 24, 469-472
- **Burkey KO, Wei C, Eason G, Ghosh P, Fenner GP (2000)** Antioxidant metabolite levels in ozone-sensitive and -tolerant genotypes of snap bean. *Physiol Plant* 110, 195-200
- **Castillo FJ, Greppin H (1988)** Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. *Environ Exp Bot*, 28, 231-238
- **Cazalé AC, Rouet-Mayer MA, Barbier-Brygoo H, Mathieu Y, Laurière C (1998)** Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. *Plant Physiol* 116, 659-669
- **Chamnonpol S, Willeksen H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann H, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1998)** Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. *PNAS* 95, 5818-5823
- **Chandlee JM (2001)** Current molecular understanding of the genetically programmed process of leaf senescence. *Physiol Plant* 113, 1-8
- **Charles SA, Halliwell B (1981)** Light activation of fructose bisphosphatase in isolated spinach chloroplasts and deactivation by hydrogen peroxide. *Planta* 151, 242-246
- **Chaudieri J, Ferrari-Ilious R (1999)** Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem Tox* 37, 949-962
- **Ciampi S, Castagna A, Ranieri A, Nali C, Lorenzini G, Soldatini G (1997)** CO<sub>2</sub> assimilation, xanthophyll cycle pigments and PSII efficiency in pumpkin plants as affected by ozone fumigation. *Physiol Plant* 101, 881-889
- **Conklin PL (2001)** Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Plant Cell Environ* 24, 383-394
- **Conklin PL, Last RL (1995)** Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. *Plant Physiol* 109, 203-212
- **Conklin PL, Williams EH, Last RL (1996)** Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc Natl Acad Sci* 93, 9970-9974
- **Cooper TG (1981)** Biochemische Arbeitsmethoden. Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York, 334 ff.

- **Córdoba F, González-Reyes JA (1994)** Ascorbate and plant cell growth. *J Bioenerg Biomembr* 26, 399-405
- **Córdoba-Pedregosa MC, González-Reyes JA, Cañadillas MS, Navas P, Córdoba F (1996)** Role of apoplastic and cell wall peroxidase on the stimulation of root elongation by ascorbate. *Plant Physiol* 112, 1119-1125
- **Creissen G, Broadbent P, Stevens R, Wellburn AR, Mullineaux P (1996)** Manipulation of glutathione metabolism in transgenic plants. *Biochem Soc Trans Free Rad Proc Plants* 24, 465-469
- **Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H (2000)** Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation. *Physiol Plant* 110, 512-517
- **Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H (2001)** The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* 39, 657-664
- **Czapski, G (1984)** Reaction of •OH. *Meth Enzym* 105, 209-215
- **Dalton DA, Russell SA, Hanus FJ, Pascoe GA, Evans HJ (1986)** Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proc Natl Acad Sci* 83, 3811-3815
- **Dangl J (1998)** Plants just say NO to pathogens. *Nature* 394, 525-526
- **Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM (1998)** Parallel changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase by salicylic acid or heat acclimation in *Mustard* seedlings. *Plant Physiol* 116, 1351-1357
- **Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998)** Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-588
- **DeMarco A, Guzzardi P, Jamet E (1999)** Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. *Plant Physiol* 120, 371-381
- **DePinto MC, DeGara L (1999)** The redox state of the ascorbate/dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco *BY-2* cells. *Protoplasma* 209, 90-97
- **Desmarchelier C, Repetto M, Coussio J, Llesuy S, Ciccía G (1997)** Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in southwest amazonia (Bolivia and Peru). *Int J Pharmacognasy* 35, 288-296
- **DeTullio MC, DeGara L, Paciolla C, Arrigoni O (1998)** Dehydroascorbate-reducing proteins in maize are induced by the ascorbate biosynthesis inhibitor lycorine. *Plant Physiol Biochem* 36, 433-440
- **DeVos CHR, Vooijs R, Schat N, Ernst, WHO (1989)** Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *J Plant Physiol* 135, 165-169
- **Dietz KJ (1997)** Function and response of the leaf apoplast under stress. *Prog Bot* 58, 221-254
- **Diop CT, 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
- **Dixon DP, Cummins I, Cole DJ, Edwards R (1998)** Glutathione-mediated detoxification systems in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1, 258-266

- **Doulis AG, Debian N, Kingston-Smith AH, Foyer CH (1997)** Differential localization of antioxidants in maize leaves. *Plant Physiol* 114, 1031-1037
- **Eckey-Kaltenbach H, Großkopf E, Sandermann JR, Ernst D (1994)** Induction of pathogen defence genes in parsley (*Petroselinum crispum* L.) plant by ozone. In: Oxygen and Environmental Stress in Plants. Proc Royal Soc Edinburgh, Section B, Crawford RMM, Hendry GAF, Goodman BA (eds.) 102, 63-74
- **Ederli L, Pasqualini S, Batini P, Antonielli M (1997)** Photoinhibition and oxidative stress: Effects on xanthophyll cycle, scavenger enzymes and abscisic acid content in tobacco plants. *J Plant Physiol* 151, 422-428
- **Edreva A (1998)** Heat shock responses of bean plants: Involvement of free radicals, antioxidants and free radical/active oxygen scavenging systems. *Biol Plant* 41, 185-191
- **Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM (1990)** Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180, 278-284
- **Edwards EA, Enard C, Creissen GP, Mullineaux PM (1994)** Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta* 192, 137-143
- **Elstner EF (1990)** Der Sauerstoff, Biochemie, Biologie, Medizin. Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich, 5-55
- **Elstner EF, Oswald W (1994)** Mechanisms of oxygen activation during plant stress. In: Proc Royal Soc Edinburgh, Section B, Crawford RMM, Hendry GAF, Goodman BA (eds.) 102, 131-154
- **Enyedi AJ (1999)** Induction of salicylic acid biosynthesis and systemic acquired resistance using the active oxygen species generator *Rose Bengal*. *J Plant Physiol* 154, 106-112
- **Eshdat Y, Holland D, Faltin Z, Ben-Hayyim G (1997)** Plant glutathione peroxidases. *Physiol Plant* 100, 234-240
- **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
- **Feder WA (1978)** Plants as bioassay systems for monitoring atmospheric pollutants. *Environ Health Persp* 27, 139-147
- **Fickenscher K, Scheibe R (1986)** Purification and properties of the cytoplasmic glucose-6-phosphat dehydrogenase from pea leaves. *Arch Biochem Biophys* 247, 393-402
- **Fisher CW, Lee D, Dodge BA, Hamman KM, Robbins JB, Martin SE (2000)** Influence of catalase and superoxide dismutase on ozone inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 66, 1405-1409
- **Forti G, Elli G (1995)** The function of ascorbic acid in photosynthetic phosphorylation. *Plant Physiol* 109, 1207-1211
- **Foyer CH, 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, Lelandais M (1996)** A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf mesophyll cells. *J Plant Physiol* 148, 391-398

- **Foyer CH, Mullineux PM (1998)** The presence of dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase in plant tissues. *FEBS Lett* 425: 528-529
- **Foyer CH, Theodoulou FL, Delrot S (2001)** The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends Plant Sci* 6, 486-492
- **Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat F, Scott IM (1997)** Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol Plant* 100, 241-254
- **Fricke W (1991)** Charakterisierung des primären N-Metabolismus einer heterotrophen Zellsuspensionskultur von *Triticum aestivum*. Reihe Biologie, Wissenschaftsverlag Dr. Wigbert Maraun, Frankfurt
- **Fridovich I (1986)** Biological effects of superoxid radical. *Arch Biochem Biophys* 247, 1-11
- **Frimer AA (1983)** in: The chemistry of functional groups, Peroxides. Patai S (ed), John Wiley and Sons Ltd. 429-461
- **Goldenberg H (1998)** Molecular biology of plasma membrane redox enzymes: a survey of current knowledge. *Protoplasma* 205, 3-9
- **Goldschmidt CPJ, Moldovan L (1999)** Stress, superoxide and signal transduction. *Gene Expr* 7, 255-260
- **Golovina EA, Tikhonov AN, Hoekstra FA (1997)** An electron paramagnetic resonance spin-probe study of membrane-permeability changes with seed aging. *Plant Physiol* 114, 383-389
- **Grace SC, Logan BA, Adams WW (1998)** Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant Cell Env* 21, 513-521
- **Grant JJ, Loake GJ (2000)** Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* 124, 21-30
- **Griffith OW (1980)** Determination of glutathione and glutathione disulfid using glutathione reductase and 2-Vinylpyridine. *Anal Biochem* 106, 207-212
- **Grosch W, Wieser H (1999)** Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *J Cer Sci* 29, 1-16
- **Günthardt-Georg MS, McQuattie CJ, Scheidegger C, Rhiner C, Matyssek R (1997)** Ozone-induced cytochemical and ultrastructural changes in leaf mesophyll cell walls. *Can J Forest Res* 27, 453-463
- **Gullner G, Tobias I, Fodor J, Komives T (1999)** Elevation of glutathione level and activation of glutathione-related enzymes affect virus infection in tobacco. *Free Radic Res* 31, 155-161
- **Gupta AS, Alschner RG, McCune D (1991)** Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiol* 96, 650-655
- **Guri A (1983)** Variation in glutathione and ascorbic acid content among selected cultivars of *Phaseolus vulgaris* prior to and after exposure to ozone. *Can J Plant Sci* 63, 733-737
- **Hagermann AE, Riedl KM, Jones A, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL (1998)** High molecular weight plant polyphenolics (Tannins) as biological antioxidants. *J Agricult Food Chem* 46, 1887-1892
- **Hancock JT, Desikan R, Neill SJ (2001)** Does the redox status of cytochrom c act as a fail-safe mechanism in the regulation of programmed cell death? *Free Radic Biol Med* 31, 697-703

- **Hausladen A, Madamanchi NR, Fellows S, Alscher RG, Amundson RG (1990)** Seasonal changes in antioxidants in red spruce as affected by ozone. *New Phytol* 115, 447-458
- **Heagle AS (1989)** Ozone and crop yield. *Annu Rev Phytopath* 27, 397-423
- **Heath RL (1987)** The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells. *Adv Phytochem* 21, 29-54
- **Heath RL, Taylor GE (1997)** Physiological processes and plant responses to ozone exposure. In: Forrester decline and ozone: a comparison of controlled chamber and field experiments ecological studies. Sandermann H, Wellburn A, Heath RL (eds.) Springer, Berlin 127, 317-368
- **Heggstad HE (1991)** Origin of *Bel W3*, *Bel C* and *Bel B* tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Env Pollut* 74, 264-291
- **Hernández JA, Talavera JM, Martínez-Gómez P, Dicenta F, Sevilla F (2001a)** Response of antioxidative enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars. *Physiol Plant* 111, 313-321
- **Hernández JA, Ferrer MA, Jimenez A, Barcelo AR, Sevilla F (2001b)** Antioxidant systems and  $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$  production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol* 127, 817-831
- **Hideg E, Spetea C, Vass I (1994)** Singlet oxygen and free radical production during acceptor- and donor-side-induced photoinhibition. Studies with spin trapping EPR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1186, 143-152
- **Hippeli S, Elstner EF (1996)** Mechanisms of oxygen activation during plant stress: Biochemical effects of air pollutants. *J Plant Physiol* 148, 249-257
- **Hodges DM, Forney CF (2000)** The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. *J Exp Bot* 51, 645-655
- **Hodges DM, Andrews CJ, Johnson DA, Hamilton RI (1996)** Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize lines. *Physiol Plant* 98, 685-692
- **Horemans N, Asars H, Caubergs RJ (1996)** Transport of ascorbate into plasma membrane vesicles of *Phaseolus vulgaris* (L). *Protoplasma* 194, 177-185
- **Horemans N, Asard H, Caubergs RJ (1997)** The ascorbate carrier in higher plant plasma membranes preferentially translocates the fully oxidized (dehydroascorbate) molecule. *Plant Physiol* 144, 1247-1253
- **Horemans N, Asard H, Caubergs RJ (1998)** Carrier mediated uptake of dehydroascorbate into higher plant plasma membrane vesicles shows trans-stimulation. *FEBS Lett* 421, 41-44
- **Horemans N, Foyer CH, Asard H (2000)** Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *TIPS* 5, 263-267
- **Hoson T (1998)** Apoplast as the site of response to environmental signals. *J Plant Res* 111, 167-177
- **Van Hove LW, 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* 114, 371-382
- **Huffaker RC (1990)** Proteolytic activity during senescence of plants. *New Phytol* 116, 199-231

- **Husted SU, Schjoerring JK (1995)** Apoplastic pH and ammonium concentration in leaves of *Brassica napus* L. *Plant Physiol* 109, 1453-1460
- **Jakob B, Heber U (1998)** Apoplastic ascorbate does not prevent the oxidation of fluorescent amphiphilic dyes by ambient and elevated concentrations of ozone in leaves. *Plant Cell Physiol* 39, 313-322
- **Jiménez A, Hernández JA, Pastori G, del Río LA, Sevilla F (1998)** Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol* 118, 1327-1335
- **Jin MH, Feng ZW, Zhang FZ (2001)** Impacts of ozone on the biomass and yield of rice in open-top chambers. *J Environ Sci* 13, 233-136
- **Joo JH, Bae YS, Lee JS (2001)** Role of Auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiol* 126, 1055-1060
- **Kálai T, Hideg E, Vass I, Hideg K (1998)** Double (fluorescent and spin) sensors for detection of reactive oxygen species in the thylakoid membrane. *Free Rad Biol Med* 24, 649-652
- **Kampfenkel K, VanMontagu M, Inzé D (1995)** Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Anal Biochem* 225, 165-167
- **Kangasjärvi J, Talvinen J, Utriainen M, Karjalainen R (1994)** Plant defence systems induced by ozone. *Plant Cell Environ* 17, 783-794
- **Kanofsky JR, Sima PD (1995)** Reactive absorption of ozone by aqueous biomolecules solution: implication for the role of sulfhydryl compounds as targets for ozone. *Arch Biochem Biophys* 316, 52-62
- **Kato N, Esaka M (1999)** Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate level in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiol Plant* 105, 321-329
- **Kelsey S (2000)** Programmed cell death in animals and plants. Edited by Bryant JA, Hughes SG, Garland JM. BIOS Scientific Publishers, 2000. *British J Haem* 110, 755
- **Kerstiens G, Lenzian KJ (1989)** Interaction between ozone and plant cuticles. I. Ozone deposition and permeability. *New Phytol* 112, 13-19
- **Knörzer OC, Lederer B, Durner J, Böger P (1999)** Antioxidative defense activation in soybean cells. *Physiol Plant* 107, 294-302
- **Kocsya G, Galibaa G, Brunoldb C (2001)** Role of glutathione in adaptation and signaling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiol Plant* 113, 158-164
- **Kollist H, Moldau H, Oksanen E, Vapaavuori E (2001)** Ascorbate transport from the apoplast to the symplast in intact leaves. *Physiol Plant* 113, 377-383
- **Kronfuss G, Wieser G, Havranek WM, Polle A (1996)** Effects of ozone and mild drought stress on total and apoplastic Guaiacol peroxidases and lipid peroxidation in current-year needles of young Norway spruce (*Picea abies* L., Karst.). *J Plant Physiol* 148, 203-206
- **Kurepa J, Smalle J, Van Montagu M, Inze D (1998)** Oxidative stress tolerance and longevity in *Arabidopsis*: the late-flowering mutant gigantea is tolerant to paraquat. *Plant J* 14, 759-764
- **Laisk A, Kull O, Moldau H (1989)** Ozone concentration in leaf intercellular spaces is close to zero. *Plant Physiol* 90, 1163-1167

- **Lam E, Pontier D, Del Ponzo O (1999)** Die and let live – programmed cell death in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2, 502-507
- **Lamoureux GL, Rusness DG (1993)** Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. In: DeKok LJ, Stulen I, Rennenberg H, Brunold C, Rauser WE (eds.) *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants*. SPB Academic Publishing, The Hague, 221-237
- **Larcher W (1994)** *Ökophysiologie der Pflanzen*. UTB, Stuttgart
- **Law MY, Charles SA, Halliwell B (1983)** Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochem J* 210, 899-903
- **Lee EH, Jersey JA, Giffrod C, Bennett J (1984)** *Environ Exp Bot* 24, 331
- **Leipner J, Oxborough K, Baker NR (2001)** Primary sites of ozone-induced perturbations of photosynthesis in leaves: identification and characterisation in *Phaseolus vulgaris* using high resolution chlorophyll fluorescence imaging. *J Exp Bot* 52, 1689-1696
- **Leprince O, Atherton NM, Deltour R, Hendry GAF (1994)** The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L. *Plant Physiol* 104, 1333-1339
- **Lohaus G, Pennewiss K, Sattelmacher B, Hussmann M, Muehling KH (2000)** Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiol Plant* 111, 457-465
- **Loretto F, Mannozi M, Maris C, Nascetti P, Ferranti F, Pasqualini S (2001)** Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. *Plant Physiol* 126, 993-1000
- **Løvaas E, Olsen JE (1998)** No induction of Polyamines and radical scavenging antioxidants in *Nicotiana tabaccum* exposed to iron excess, as investigated by DPPH assay and differential spectroscopy. *J Plant Physiol* 153, 401-408
- **Lu H, Higgins VJ (1998)** Measurement of active oxygen species generated *in planta* in response to elicitor AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 52, 35-51
- **Lucas P, Rantanen L, Mehlhorn H (1993)** Needle chlorosis in Sitka spruce following a three-year exposure to low concentration of ozone: Change in mineral content, pigmentation and ascorbic acid. *New Phytol* 124, 265-275
- **Luikenhuis S, Perrone G, Dawes IW, Grant CM (1998)** The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* 9, 1081-1091
- **Luwe M (1996)** Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves: seasonal variations and responses to changing ozone concentrations in mais. *Plant Cell Environ* 19, 321-328
- **Luwe MWF, Heber U (1995)** Ozone detoxification in the apoplast and symplast of spinach, broad bean and beech leaves at ambient and elevated concentrations of ozone in air. *Planta* 197, 448-455
- **Luwe MWF, 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, Ollerrenshaw JH, Barnes JD (1999)** Impacts of ozone on *Plantago major*; apoplastic and symplastic antioxidant status. *New Phytol* 141, 253-263

- **Mackerness SAH, Jordan BR, Thomas B (1999)** Reactive oxygen species in the regulation of photosynthetic genes by ultraviolet-B-radiation (UB-B: 280-320 nm) in green and etiolated bud of pea (*Pisum sativum* L.). *J Photochem Photobiol B* 48, 180-188
- **Maldonado C, Pahlich E (1997)** Stability and autoregulation of the cytoplasmic glutathione-redox-system in wheat cultivars under mild water deficit. *Russ J Plant Physiol* 44, 448-453
- **Manning WJ, Tiedemann v A (1995)** Climate change: Potential effects of increased atmospheric carbon dioxide (CO<sub>2</sub>), ozone (O<sub>3</sub>) and ultraviolet-B (UV-B) radiation on plant diseases. *Environ Pol* 88, 219-245
- **Mason RP, Knecht KT (1994)** In vivo detection of radical adducts by electron spin resonance. *Meth Enzym* 233, 112-117
- **Matsumura H, Miyachi S (1980)** Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides. *Meth Enzym* 69, 465-470
- **May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inze D (1998)** Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* 49, 649-667
- **Mehdy MC (1994)** Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol* 105, 442-467
- **Mehlhorn H, Tabner BJ, Wellburn AR (1990)** Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plants exposed to ozone. *Physiol Plant* 79, 377-383
- **Meister A, Anderson ME (1983)** Glutathione. *Ann Rev Biochem* 52, 711-760
- **Mikkelsen TN, Dodell B, Lutz C (1995)** Changes in pigment concentration and composition in Norway spruce induced by long-term exposure to low levels of ozone. *Environ Pollut* 87, 197-205
- **Miller NJ, Rice-Evans CA (1996)** Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Rep* 2, 161-171
- **Miller JD, Arteca RN, Pell EJ (1999)** Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 120, 1015-1024
- **Moldau H (1998)** Hierarchy of ozone scavenging reactions in the plant cell wall. *Physiol Plant* 104, 617-622
- **Moldau H (1999)** Ozone detoxification in the mesophyll cell wall during a simulated oxidative burst. *Free Radic Res* 31, 19-24
- **Moldau H, Padu E, Bichele I (1997)** Quantification of ozone decay and requirement for ascorbate in *Phaseolus vulgaris* L. mesophyll cell walls. *Phyton, Special Issue: "Free Radicals"* 37, 175-180
- **Morell S, Follmann H, De Tullio M, Haberlein I (1997)** Dehydroascorbate and dehydroascorbate reductase are phantom indicators of oxidative stress in plants. *FEBS Lett* 414, 567-570
- **Morita S, Kaminaka H, Masumura T, Tanaka K (1999)** Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress; the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signaling. *Plant Cell Physiol* 40, 417-422
- **Mudd JB (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

- **Mullineaux PM, Creissen GP (1997)** Glutathione reductase: Regulation and role in oxidative stress. In: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defense. Scandalios JG (ed.) Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 667-714
- **Mullineaux P, Ball L, Escobar C, Karpinska B, Creissen G, Karpinski S (2000)** Are diverse signaling pathways integrated in the regulation of *Arabidopsis* antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 1531-1540
- **Nagalakshmi N, Prasad MNV (2001)** Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci* 160, 291-299
- **Nakano Y, Asada K (1981)** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22, 867-880
- **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
- **Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri CML (1996)** Superoxide generation in relation to dehydration and rehydration. *Biochem Soc Trans Free Rad Proc Plants* 24, 447-451
- **Navari-Izzo F, Meneguzzo S, Loggini B, Vazzana C, Sgherri CLM (1997)** The role of the glutathione system during dehydration of *Boea hygroskopica*. *Physiol Plant* 99, 23-30
- **Nie GY, Tomasevic M, Baker NR (1993)** Effects of ozone on the photosynthetic apparatus and leaf proteins during leaf development in wheat. *Plant Cell Environ* 16, 643-651
- **Noctor G, Foyer CH (1998)** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49: 249-279
- **Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Foyer CH (2000)** Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signaling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 1465-1475
- **Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Valadier MH, Roux Y, Foyer CH (1997)** The role of glycine in determining the rate of glutathione synthesis in poplar: Possible implications for glutathione production during stress. *Physiol Plant* 100, 255-263
- **Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Kunert KJ, Renneberg H, Foyer CH (1998)** Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot* 49, 623-647
- **Nooden LD, Penney JP (2001)** Correlative controls of senescence and plant death in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *J Exp Bot* 52, 2151-2159
- **O’Kane D, Gill V, Boyd P, Burdon R (1996)** Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in *Arabidopsis thaliana* callus. *Planta* 198, 371-377
- **Obinger C, Regelsberger G, Pircher A, Strasser G, Peschek GA (1998)** Scavenging of superoxide and hydrogen peroxide in blue-green algae (cyanobacteria). *Physiol Plant* 104, 693-698
- **Ohlenschläger G (1995)** Was sind freie Radikale. *GIT Labor-Magazin*, 18, 337-349
- **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

- **Omran RG (1980)** Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase and indolacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings. *Plant Physiol* 65, 407-408
- **Pacifici RE, Davies KJA (1990)** Protein degradation as an index of oxidative stress. *Meth Enzym* 186, 485-502
- **Packer L, Weber SU, Rimbach G (2001)** Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signaling. *J Nutr* 131, 369S-373S
- **Pallanca JE, Smirnoff N (1999)** Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of D-Glucosone, L-Sorbosone and L-Galactono-1,4-Lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiol* 120, 453-461
- **Pasqualini S, Batini P, Ederli L, Porceddu A, Piccioni C, DeMarchis F, Antonielli M (2001)** Effects of short-term ozone fumigation on tobacco plants: response of the scavenging system and expression of the glutathione reductase. *Plant Cell Env* 24, 245
- **Pell EJ, Pearson NS (1983)** Ozone-induced reduction in quantity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in *Alfalfa* foliage. *Plant Physiol* 73, 185-187
- **Pell EJ, Schlagnhauser CD, Arteca RN (1997)** Ozone induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiol Plant* 100, 265-273
- **Pell EJ, Enyedi A, Eckhardt N, Landry L (1990)** Ozone induced alterations in quantity and activity of *Rubisco*: implications for foliar senescence. In: Reddy, Hamilton, Madyashta (eds.) *Proceedings of International Symposium on Biological Oxidation Systems*. Academic Press, San Diego, CA, 389-403
- **Pellinen R, Palva T, Kangasjärvi J (1999)** Subcellular localisation of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J* 20, 349-356
- **Peltzer D, Polle A (2001)** Diurnal fluctuations of antioxidative systems in leaves of field-grown beech trees (*Fagus sylvatica*): Responses to light and temperature. *Physiol Plant* 111, 158-164
- **Penel C, Castillo FJ (1989)** Peroxidase of plant plasma membranes, apoplastic ascorbate and relation of redox activities to plant pathology. In: Crane FL, More DJ, Low JE (eds.) *Oxidoreduction at the plasma membrane (Relation to growth and transport)* Vol. 2 CRC Press Boca Raton FL, 121-147
- **Pfannschmidt T, Allenb JF, Oelmüller R (2001)** Principles of redox control in photosynthesis gene expression. *Physiol Plant* 112, 1-9
- **Pladys D, Dimitrijevic L, Rigaud J (1991)** Localization of a protease in protoplast preparations in infected cells of French bean nodules. *Plant Physiol* 97, 1174-1180
- **Plöchl M, Lyons T, Ollerenshaw J, Barnes J (2000)** Simulating ozone detoxification in the leaf apoplast through the direct reaction with ascorbate. *Planta* 210, 454-467
- **Polidoris AN, Scandalios JG (1999)** Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol Plant* 106, 112-120
- **Polla BS, Cronjé MJ, Bornman L (1998)** Stress symposium in Johannesburg: plants versus humans. *Cell Stress Chaperones* 3, 143-146
- **Polle A, Chakrabarti K, Schürmann W, Rennenberg H (1990)** Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). *Plant Physiol* 94, 312-319

- **Polle A, Wieser G, Havranek WH (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
- **Porra (1989)** Chlorophyll. *Biochim Biophys Acta* 975, 384-394
- **Postek MT, Tucker SC (1976)** A new short chemical dehydration method for light microscopy preparations of plant material. *Can J Bot* 54, 872-875
- **Potrykus I, Shillito RD (1986)** Protoplasts: Isolation, Culture, Plant Regeneration. *Meth Enzym* 118, 549-578
- **Potters G, Horemans N, Caubergs RJ, Asard H (2000)** Ascorbate and dehydroascorbate influence cell cycle progression in a tobacco cell suspension. *Plant Physiol* 124, 17-20
- **Pou S, Hassett DJ, Britigan BE, Cohen MS, Rosen GM (1989)** Problems associated with spin trapping oxygen-centered free radicals in biological systems. *Anal Biochem* 177, 1-6
- **Prakash JS, Baig MA, Mohanty P (2001)** Differential changes in the steady state levels of thylakoid membrane proteins during senescence in *Cucumis sativus* cotyledons. *Z Naturf* 56, 585-592
- **Prasad KVS, Pardha Saradhi P, Sharmila P (1999)** Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environ Exp Bot* 42, 1-10
- **Price A, Lucas PW, Lea PJ (1990)** Age dependent damage and glutathione metabolism in ozone fumigated barley: A leaf section approach. *J Exp Bot* 41, 1309-1317
- **Prochazkova D, Sairam RK, Srivastava GC, Singh DV (2001)** Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Sci* 161, 765-771
- **Putter J (1965)** Peroxidases In: *Meth Enzym Anal* 2, Bergmeyer HU (ed.) Academic Press, New York, 685-690
- **Ranieri A, Urso GD, Nali C, Lorenzini G, Soldatini GF (1996)** Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiol Plant* 97, 381-387
- **Ranieri A, Castagna A, Padu E, Moldau H, Rahi M, Soldatini GF (1999)** The decay of ozone through direct reaction with cell wall ascorbate is not sufficient to explain the different degrees of ozone-sensitivity in two poplar clones. *J Plant Physiol* 154, 250-255
- **Ranieri A, Serini R, Castagna A, Nali C, Baldan B, Lorenzini G, Soldatini GF (2000)** Differential sensitivity to ozone on two poplar clones. *Physiol Plant* 110, 181-188
- **Rao MV, Davis KR (1999)** Ozone induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *Plant J* 17, 603-614
- **Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP (1996)** Ultraviolet-B-and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 110, 125-136
- **Rao MV, Koch JR, Davis KR (2000)** Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Mol Biol* 44, 345-358
- **Rebber JF, Gregory C, Connolly M, Dumont E, Nazzareno B (1998)** ATP-dependent transport of reduced glutathione on YCF1, the yeast orthologue of mammalian multidrug resistance associated proteins. *J Biol Chem* 273, 33449-33454

- **Reeves SG, Hall DO (1973)** The stoichiometry (ATP/2e<sup>-</sup> ratio) of non-cyclic photophosphorylation in isolated spinach chloroplast. *Biochim Biophys Acta* 314, 66-78
- **Renneberg H, Brunold C (1994)** Significance of glutathione metabolism in plants under stress. *Prog Bot* 55, 142-156
- **Rhee SG (1999)** Redox-signaling: Hydrogen peroxide as intracellular messengers. *Exp Mol Med* 31, 53-59
- **Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996)** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 20, 933-956
- **Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997)** Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2, 152-159
- **Robak J, Gryglewski RJ (1988)** Flavonoides are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 37, 837-841
- **Robinson SP (1987)** Separation of chloroplasts and cytosol from protoplasts. *Meth Enzym* 148, 188-194
- **Roby D, Broglie K, Gaynor J, Broglie R (1991)** Regulation of a chitinase gene promoter by ethylene and elicitors in bean protoplasts. *Plant Physiol* 97, 433-439
- **Röth E-P (1994)** Ozonloch – Ozonsmog, Grundlagen der Ozonchemie. B. I. – Taschenbuchverlag (Meyers Forum), Mannheim 17ff
- **Rose RC (1990)** Ascorbic acid metabolism in protection against free radicals: A radiation model. *Biochem Biophys Res Com* 169, 430-436
- **Roxas VP, Lodhi SA, Garrett DK, Mahan JR, Allen RD (2000)** Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol* 41, 1229-1234
- **Rucinska R, Waplak S, Gwózdź EA (1999)** Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiol Biochem* 37, 187-194
- **Runneckles VC, Chevone BI (1992)** Crop responses to ozone. In: Lefohn AS (ed.) Surface level ozone exposures and their effects on vegetation. Lewis Publishers, Chelsea, MI, 189-270
- **Sävenstrand H, Brosché M, Ängelshagen M, Strid Å (2000)** Molecular markers for ozone stress isolated by suppression subtractive hybridisation: specificity of gene expression and identification of a novel stress-regulated gene. *Plant Cell Environ* 23, 689-700
- **Sakaki T, Tanaka K, Yamada M (1994)** General metabolic changes in leaf lipids in response to ozone. *Plant Cell Physiol* 5: 53-62
- **Sakurai N (1998)** Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. *J Plant Res* 111, 133-148
- **Salawitch RJ (1998)** A greenhouse warming connection. *Nature* 392, 551-552
- **Salin ML (1987)** Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol Plant* 72, 681-689
- **Samuel MA, Miles GP, Ellis BE (2000)** Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signaling in plants. *Plant J* 22, 367-376
- **Sander mann H Jr (1996)** Ozone and plant health. *Ann Rev Phytopathol* 34, 347-366
- **Sander mann H Jr (1998)** Ozone: An air pollutant acting as a plant-signaling molecule. *Naturwissenschaften* 85, 369-375

- **Sandermann H Jr (2000)** Active oxygen species as mediators of plant immunity: three studies. *Biol Chem* 381, 649-653
- **Santos-Ocana C, Cordoba F, Crane FL, Clarke CF, Navas P (1998)** Coenzyme Q6 and iron reduction are responsible for the extracellular ascorbate stabilization at the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 8099-8105
- **Scandalios JG (1993)** Oxygen stress and superoxid dismutase. *Plant Physiol* 101, 7-12
- **Schmitt R, Sandermann H Jr (1990)** Biochemical response of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) towards 14-month exposure to ozone and acid mist: part II – effects on protein biosynthesis. *Environ Pol* 64, 367-373
- **Schraudner M, Langebartels C, Sandermann H Jr (1996)** Plant defence systems and ozone. *Biochem Soc Trans* 24, 456-461
- **Schraudner M, Langebartels C, Sandermann H (1997)** Changes in the biochemical status of plant cells induced by the environmental pollutant ozone. *Physiol Plant* 100, 274-280
- **Schraudner M, Moeder W, Wiese C, VanCamp W, Inzé D, Langebartels C, Sandermann H Jr (1998)** Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitoring plant, tobacco *Bel W3*. *Plant J* 16, 235-245
- **Sen CK (2000)** Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul* 36, 1-30
- **SenGupta A, Alscher RG, McCune D (1991)** Response of photosynthesis and cellular antioxidant to ozone on *Populus* leaves. *Plant Physiol* 96, 650-655
- **SenGupta A, Webb RP, Holaday AS, Allen RD (1993)** Overexpression of superoxid dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol* 103, 1067-1073
- **Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS (1999)** Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect* 107, 5-24
- **Sharma YK, Davis KR (1994)** Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 105, 1089-1096
- **Sharma YK, Davis KR (1997)** The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Rad Biol Med* 23, 480-488
- **Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ (1997)** Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol* 115, 527-532
- **Skrivastava MK, Dwivedi UN (1998)** Salicylic acid modulates glutathione metabolism in pea seedlings. *J Plant Physiol* 153, 409-414
- **Smirnoff N (1993)** The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* 125, 27-58
- **Smirnoff N (1996)** The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Anal Bot* 78, 661-669
- **Smirnoff N (2000a)** Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Curr Opin Plant Biol* 3, 229-235
- **Smirnoff N (2000a)** Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 1455-1464
- **Smirnoff N, Pallanca JE (1996)** Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochem Soc Trans Free Rad Proc Plants* 24, 472-478
- **Smirnoff N, Wheeler GL (2000)** Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35, 291-314

- **Smith (1983)** Malatdehydrogenase: General. In: Meth Enzym Anal 3, Bergmeyer HU (ed.) Verlag Chemie Weinheim, 163-166
- **Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA (1988)** Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid). Anal Biochem 175, 408-413
- **Städler S, Ziegler H (1993)** Illustration of the genetic differences in ozone sensitivity between the varieties *Nicotiana tabacum* Bel W<sub>3</sub> and Bel B using various plant systems. Bot Acta, 106, 265-276
- **Stitt M, Mc Lilley R, Gerhardt R, Heldt HW (1989)** Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. Meth Enzym 174, 518-552
- **Streb P, Feierabend J (1996)** Oxidative stress responses accompanying photoinactivation of catalase in NaCl-treated rye leaves. Bot Acta 109, 125-132
- **Strohm M, Eiblmeier M, Langebartels C, Jouanin L, Polle A, Sandermann H, Rennenberg H (1999)** Response of transgenic poplar (*Populus tremula* x *P. alba*) overexpressing glutathione synthetase or glutathione reductase to acute ozone stress: visible injury and leaf gas exchange. J Exp Bot 50, 365-374
- **Svalheim O, Robertsen B (1993)** Elicitation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cucumber hypocotyls segments by oligo-1,4- $\alpha$ -D-galacturonides and oligo- $\beta$ -glucan preparation from cell walls of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. Physiol Plant 88, 675-681
- **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 (1992)** Regulation of peroxidase-oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. Plant Cell Physiol 33, 379-387
- **Takahama U, Oniki T (1997)** Enhancement of peroxidase-dependent oxidation of sinapyl alcohol by an apoplastic component, 4-coumaric acid ester isolated from epicotyls of *Vigna angularis* (L). Plant Cell Physiol 38, 456-462
- **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
- **Taulavuori E, Taulavuori K, Laine K (1999)** Seasonality of glutathione dynamics in Scots Pine and Bilberry. Plant Biol 1, 187-191
- **Tao DL, Öquist G, Wingsle G (1998)** Active oxygen scavengers during cold acclimation of scots pine seedlings in relation to freezing tolerance. Cryobiol 37, 38-45
- **Thompson GA (1994)** Molecular changes in membrane lipids during cold stress. In: Environmental stress in Plants, Cherry JH, Nato AsI (eds.) 619, Springer Verlag, 249-257
- **Tokarska-Schlattner M, Fink A, Castillo FJ, 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
- **Urbach W (1976)** Experimente zur Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- **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
- **Vanacker H, Harbinson J, Ruisch J, Carver TLW, Foyer CH (1998a)** Antioxidant defense of the apoplast. *Protoplasma* 205, 129-140
- **Vannacker H, Foyer CH, Carver TLW (1998b)** Changes in apoplastic antioxidants induced by powery mildew attack in oat genotypes with race non-specific resistance. *Planta* 208, 444-452
- **Vanacker H, Carver TLW, Foyer CH (2000)** Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the *Barley*-powdery mildew interaction. *Plant Physiol* 123, 1289-1300
- **Velikova V, Yordanov I, Edreva A (2000)** Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants; protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci* 151, 59-66
- **Veljovic-Jovanovic SD, Pignocchi C, Noctor G, Foyer CH (2001)** Low ascorbic acid in the *vtc-1* mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiol* 127, 426-435
- **Wang J, Zhang H, Allen RD (1999)** Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiol* 40, 725-732
- **Weber JA, Tingey DT, Andersen CP (1994)** Plant response to air pollution; In: *Plant-Environment Interactions*. Wilkinson E, Dekker M (eds.) New York, 357-387
- **Wellburn AR, Wellburn FA (1996)** Gaseous pollutants and plant defense mechanisms. *Biochem Soc Trans* 24, 461-464
- **Wellburn AR, Paul ND, Mehlhorn H (1994)** The relative implications of ozone formation both in the stratosphere and the troposphere. In: *Oxygen and Environmental Stress in Plants*, Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, Section B 102, Crawford RMM, Hendry GAF, Goodman BA (eds.), 33-47
- **Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1997)** Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. *EMBO J* 16, 4806-4816
- **Wingsle G, Karpinski S (1996)** Differential redox regulation by glutathione of glutathione reductase and CuZn-superoxide dismutase gene expression in *Pinus sylvestris* L. needles. *Planta* 198, 151-157
- **Wingsle G, Mattson A, Ekblad A, Hällgren J-E, Selstam E (1992)** Activities of glutathione reductase and superoxide dismutase in reaction to changes in lipids and pigments due to ozone in seedlings of *Pinus sylvestris* (L.). *Plant Sci* 82, 167-178
- **Wise RR, Naylor AW (1987)** Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol* 83, 278-282
- **Wyllie A (1998)** Apoptosis – an endonuclease at last. *Nature* 391, 20-21

- **Xiang C, Werner BL, Christensen E'LM, Oliver DJ (2001)** The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione level. *Plant Physiol* 126, 564-574
- **Yamaguchi K, Mori H, Nishimura M (1995)** A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol* 36, 1157-1162
- **Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N (1997)** Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cell against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol* 115, 1405-1412
- **Ye Z, Rodriguez R, Tran A, Hoang H, de los Santos D, Brown S, Vellanoweth RL (2000)** The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 158, 115-127
- **Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S (2000)** Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol* 123, 223-234
- **Yun SC, Laurence JA (1999)** The response of sensitive and tolerant clones of *Populus tremuloides* to dynamic ozone exposure under controlled environmental conditions. *New Phytol* 143, 305-313
- **Zellner R (1991)** Ozon in der Atmosphäre - Anthropogene Veränderungen und Risiken. *Zeitschrift für Umweltchem Ökotoxikol* 3, 52-58
- **Zinser C, Jungblut T, Heller W, Seidlitz HK, Schnitzler JP, Ernst D, Sandermann H Jr (2000)** The effect of ozone in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.): gene expression, biochemical changes and interactions with UV-B radiation. *Plant Cell Env* 23, 975-982

# Danke

Einen ganz besonderen Dank gilt meinen beiden „Doktorvätern“ Prof. Dr. E. Pahlich und Prof. Dr. Dr. h.c. H-J Jäger, die mir durch die Überlassung des Themas und ihre Hilfestellungen und Anregungen während der Arbeit ermöglichten, grenzüberschreitend zu arbeiten und physiologische und ökologische Denkweisen miteinander zu verbinden.

Einen herzlichen Dank an alle Mitarbeiter der ZBB und vor allem Frau Dr. Richter, unter deren Anleitung alle elektronenmikroskopischen Arbeiten erfolgten.

Einen lieben Gruß möchte ich nach Griechenland an Meropi schicken, mit der ich viele unterhaltsame Stunden nicht nur beim Infiltrieren verbracht habe. An dieser Stelle sei auch Birte für ihre Unterstützung beim geduldigen Ein- und Auswickeln gedankt.

Vielen Dank auch an Verena, Doris, Carsten, Steffi und Carlos für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Vielen Dank allen Helfern im freien Feld, die mit mir zusammen die Gartenschläuche geschwungen haben und Trockenheit und Nässe, Kälte und Hitze erduldeten. Vor allem Danke an Flo, der jetzt noch viel mehr erdulden muss (♥).

Vielen Dank an Jasmin und die Belegschaft im Gewächshaus für Rat und Tat und hin und wieder hilfreiche Gemische.

HERRLICHE Grüße an Markus, der die „trockene“ Wissenschaft durch seine künstlerischen Taten erfrischte.

Einen ganz besonderen Dank an Sabine, die mir nicht nur bei der praktischen Arbeit aufmerksam über die Schulter geschaut hat, sondern auch jederzeit gerne mit Hand anlegte und es immer verstand und noch versteht, mir bei Bedarf liebevoll in den H... zu treten.

Viele Grüße und Küsse an Daggi, die die Chloroplasten wieder entdeckte und nach den Bulbillen nun auch noch den Apoplasten lieben lernen musste, und die dies wie immer konsequent und von ganzem Herzen tat. Viele Küsse auch an Sascha, für die immer liebevoll unter die Haut gehenden Kommentare und vor allem für die Blondinensicherung meines PC's.

Und vor allem meinem Vater einen ganz besonderen Dank für die Liebe und Unterstützung, die mich dahin brachte, wo ich heute bin.