

# Pflanzenphysiologisches Praktikum für Studierende Biologie-Bachelor und Lehramt Gymnasium WS 2017/18

**29.1. – 2.2. 2018: Bachelor Biologie (3er Gruppen)**

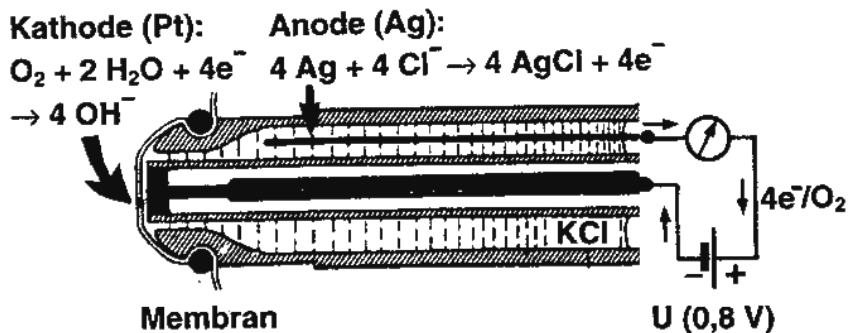
**5.2. – 9.2. 2018: Lehramt Gymnasium (3-4er Gruppen)**

Die 5 Versuchskomplexe werden von den Gruppen im Rotationsprinzip im Laufe der Woche durchgeführt. Pro Praktikumstag wird ein Versuchskomplex bearbeitet.

- 1. Komplex (Atmung, Photosynthese, Gennachweis)**
  - 1.1. Bestimmung der Respirationsrate sowie Aufnahme der Photosynthese/Licht-Kurve einer Cyanobakterienkultur mit Hilfe der O<sub>2</sub>-Messung **S. 2**
  - 1.2. Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität in Cyanobakterienzellen als Maß für die Respiration **S. 4**
  - 1.3. Nachweis von T-DNA-Fragmenten in transgenen Pflanzen durch PCR **S. 6**
  
- 2. Komplex (Photosynthesepigmente)**
  - 2.1. Absorptionsspektrum, *in vivo* Pigmentkonzentrationen von Cyanobakterienkulturen **S. 10**
  - 2.2. *in-vitro*-Chlorophyll-a-Gehalt: Vgl. Cyanobakterien mit Pflanzen **S. 12**
  - 2.3. Dünnschichtchromatographische Trennung von Pigmenten **S. 13**
  - 2.4. *in-vitro*-Bestimmung des Phycocyaningehaltes in Cyanobakterien **S. 14**
  
- 3. Komplex (Ionengehalt/Osmotisches Potential bei Glyko- und Halophyten)**
  - 3.1. Chloridbestimmung in Presssäften durch maßanalytische Chloridbestimmung mit Silbernitrat **S. 16**
  - 3.2. Bestimmung der Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Konzentration in Presssäften mit Hilfe der Flammenphotometrie **S. 18**
  - 3.3. Bestimmung der osmotischen Konzentration in Presssäften durch Gefrierpunktsmometrie **S. 19**
  
- 4. Komplex (Molekulare Pflanzenphysiologie, Hormone)**
  - 4.1. Nachweis von Isoenzymen der Superoxiddismutase **S. 21**
  - 4.2. Induktion von amylyolytischer Aktivität im Endosperm der Gerstenkaryopse durch Gibberellin **S. 24**
  
- 5. Komplex (Photosynthese, Histologie)**
  - 5.1. Nachweis der gewebespezifischen Genexpression durch GUS-Färbung **S. 25**
  - 5.2. Bestimmung des mittleren Wasserpotentials des Kartoffelparenchyms Presssäften mit Hilfe des Gefrierpunktsmometers **S. 26**
  - 5.3. Isolation von Chloroplastenfragmenten aus Pflanzenblättern zum Nachweis der Hill-Reaktion **S. 27**
    - 5.3.1. Nachweis mit Hilfe der Sauerstoffelektrode
    - 5.3.2. Kolorimetrischer Nachweis des Elektronentransportes
  
- 6. Anhang – Hinweise zur Protokollierung **S. 29****  
**Notwendige Ausrüstung der Studenten/innen **S. 30****

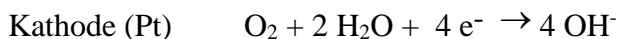
### 1.1. Bestimmung der Respirationsrate sowie Aufnahme der Photosynthese-Licht-Kurve einer Cyanobakterienkultur durch elektrochemische O<sub>2</sub>-Messung, Bestimmung des Lichtkompensationspunktes

Respiration und Photosynthese sind die wichtigsten energieliefernden Prozesse in Pflanzen. Zu ihrer quantitativen Bestimmung wird der Gaswechsel an Pflanzen, Pflanzenextrakten oder Einzelzellen verfolgt. Methodisch am einfachsten ist dabei die Verfolgung der Sauerstoffaufnahme bzw. -abgabe. Für die Messung von Sauerstoffumsätzen wird heute vor allem die Sauerstoffelektrode nach Clark (1956) benutzt. Die nachstehende Abbildung gibt das Messprinzip wieder.

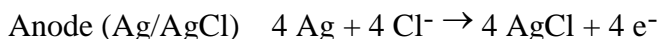


**Abbildung 1:** Aufbau und Messprinzip der Sauerstoffelektrode nach Clark.

Eine Platin-Kathode (Pt) wird einer Polarisierungsspannung von 0,6-0,9 V ausgesetzt, als Bezugssystem dient eine Silber (Ag)/AgCl-Anode. Als leitende Verbindung im Elektrodenraum dient eine gesättigte KCl-Lösung. Die Elektrode wird durch eine O<sub>2</sub>-durchlässige Teflonmembran nach außen hin abgegrenzt. In Anwesenheit von gelöstem Sauerstoff in einer Messlösung, in die man die Elektrode taucht, diffundiert der Sauerstoff durch die Membran in den Innenraum und wird an der negativ geladenen Pt-Kathode reduziert.

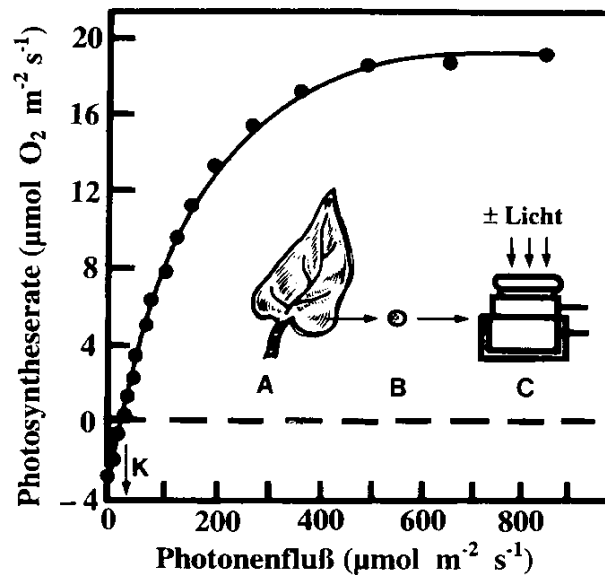


Gleichzeitig kommt es an der positiv geladenen Anode zu einer Oxidation des Silbers:



Es fließt somit ein elektrischer Strom, der direkt proportional zur O<sub>2</sub>-Konzentration im Wasser ist (4e<sup>-</sup> pro 1 O<sub>2</sub>); durch Messung dieses Elektrodenflusses (als Spannung) kann die gelöste O<sub>2</sub>-Menge pro Volumen Medium gemessen werden.

Die Abhängigkeit der Photosyntheserate von der Lichtintensität wird durch Licht-Photosynthesekurven (P/I-Kurven) dargestellt. Bei geringer Beleuchtung steigt die Photosyntheserate proportional zur ansteigenden Photonenflussdichte an. Mit zunehmender Beleuchtungsstärke tritt Lichtsättigung ein. Bei noch höherer Lichtintensität setzt eine Photosynthesehemmung ein. Diejenige Beleuchtungsstärke, bei der die Intensität der Bruttophotosynthese gleich derjenigen der Atmung ist, die Nettophotosynthese also gleich Null ist, repräsentiert den Lichtkompensationspunkt (K, siehe Abb. 2).



**Abbildung 2:** Abhängigkeit der Photosyntheserate eines Sonnenblattes von Spinat von der Lichtintensität (Photonenflussdichte) - PS/Licht-Kurve, K- Lichtkompensationspunkt; (nach Walker, 1995).

**Untersuchungsobjekt:** Cyanobakterienstamm *Synechocystis* sp. PCC 6803

**Geräte:** Sauerstoffmessgerät, Clark-Elektrode, Messkammer, Schreiber, Lichtmessgerät, Thermostat

### Durchführung

Vor Beginn der Messungen kontrollieren, dass die Messkammer auf 29°C temperiert, der Schreiber auf 1 V bzw. 1 cm/min eingestellt und der Rührer angeschaltet ist.

#### 1. Eichung:

- Die Sauerstoffelektrode wird mit O<sub>2</sub>-gesättigtem A. dest. geeicht.
- Das Wasser wird eingefüllt und die Messkammer offen gelassen.
- Der Schreiber wird eingeschaltet und so lange gemessen, bis eine senkrechte Linie geschrieben wird. Der angezeigte Wert (in V) wird notiert.
- Die Eichung sollte am Ende der Messungen wiederholt werden.
- **Nach der Eichung darf am Gerät nichts mehr verstellt werden.**

#### 2. Messung:

- 4 ml Cyanobakteriensuspension in die Messkammer einfüllen (falls O<sub>2</sub>-Sättigung zu hoch ist, so dass Schreiberbereich nicht ausreicht, kann die Probe für ca. 3 min mit Stickstoff begast werden, um den O<sub>2</sub>-Gehalt zu vermindern)
- Messkammer verdunkeln und für 5-10 min Respiration messen (es soll sich ein konstant schräg laufender Strich nach links einstellen)
- Zur Photosynthesemessung wird die Verdunklung abgenommen und der Diaprojektor eingeschaltet.
- Die Beleuchtungsstärke sollte im sättigenden Bereich liegen, der durch sich schrittweises Annähern an die Messkammer festgestellt wird.
- Die Lichtintensitäten werden mit dem Lichtmessgerät bestimmt.

- Die Photosyntheserate wird bei jeder Lichtintensität für 2-5 min verfolgt, bis sich ein konstant schräger Strich nach rechts eingestellt hat.
- **als Bezugswert immer von der 1+9 (10fach) verdünnten Suspension die Extinktion bei 750 nm am Photometer bestimmen**

### 3. Berechnung:

100 % luftgesättigtes Wasser enthält ca. 8 µg/ml O<sub>2</sub> (entspricht dem Eichwert). Auf den Schreiberprotokollen wird der Anstieg für jede Lichtintensität über ein Anstiegsdreieck bestimmt, d.h. es wird die Zu- bzw. Abnahme der Spannung (in V) pro Minute abgelesen.

Sauerstoffproduktionsrate pro ml Algen und E<sub>750</sub>:

$$O_2 \text{ (}\mu\text{g/ml/min/E}_{750}\text{)} = \frac{8 \times \text{Messwert Probe (V)}}{\text{Messwert Eichwert (V)} \times E_{750} \times 1 \text{ min} \times \text{Probenvolumen (ml)}}$$

### Auswertung

Mit den berechneten Werten ist die P/I-Kurve (vgl. Abb. 2) zu zeichnen.

Der Lichtkompensationspunkt K kann durch Berechnung der linearen Regressionsfunktion zwischen Respirationwert, den Werten für die O<sub>2</sub>-Produktion bei geringen Lichtintensitäten (Respiration, Lichtstufen 1, 2 evtl. 3; y-Werte) und den dazugehörigen Lichtintensitäten (x-Werte) ermittelt werden. Diese lineare Funktion ist ebenfalls graphisch darzustellen.

Anhand der Formel der Regressionsgeraden ist der Lichtkompensationspunkt K zu berechnen. Dieser entspricht der Lichtintensität x, bei der die Nettophotosynthese gleich Null ist (y = 0).

## 1.2. Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität in Cyanobakterienzellen als Maß für die Respiration

Dehydrogenasen übertragen Elektronen mit Hilfe von Coenzymen wie NAD<sup>+</sup> bzw. NADP<sup>+</sup>. Die Coenzym-gebundenen Elektronen können dann u.a. in die Atmungskette eingeschleust werden. Eine *in vivo* Summenbestimmung der Dehydrogenaseaktivitäten ist durch Inkubation mit dem Redoxfarbstoff MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) möglich. Die Dehydrogenasen übertragen hierbei statt auf NAD<sup>+</sup> bzw. NADP<sup>+</sup> die Elektronen auf MTT. Die MTT-Reduktion führt zur Entstehung eines farbigen Formazans, das kolorimetrisch nachweisbar ist (Abb. 3). Neben einem Kontrollansatz (Ansatz A) wird die Formazanbildung unter Glucosezugabe untersucht (Ansatz B).

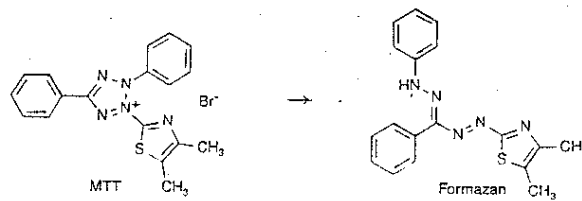
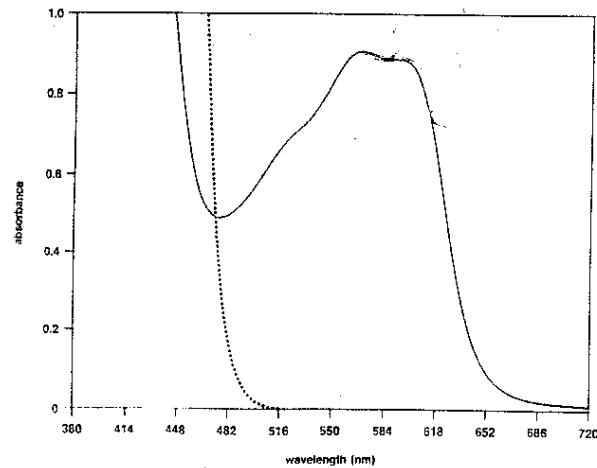


Fig. 1: By the action of mitochondrial dehydrogenases MTT is metabolized to form a formazan salt.



**Abbildung 3:** Darstellung der MTT-Reduktion sowie des daraus resultierenden Absorptionsverhaltens (gepunktete Linie - MTT, durchgezogene Linie – Formazan)

**Untersuchungsobjekt:** Cyanobakterienstamm *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Die Zelldichte muss zuvor mit Medium auf  $E_{750}$  ca. 0,9 eingestellt werden. Es werden ca. 25 ml benötigt.)

**Material:** MTT-Stammlösung: 50 mg/10 ml Phosphatpuffer (10 mM); Stopplösung: 96% Isopropanol + 85% Ameisensäure (95/5 - v/v); 1 M Glucose (Endkonz. 10 mM); BG11 Standardmedium

### Durchführung

- 17 Eppendorfgefäße (2 ml) beschriften (A1, A2, ... A8, B1, B2, ... B8 sowie Blindansatz)
- je 0,8 ml Stopplösung einfüllen und verschließen
- Für den Blindansatz werden in einem Rotdeckelröhrchen (15 ml) 5 ml A. dest. mit 0,5 ml MTT-Lösung gemischt, davon 0,8 ml entnommen und zu der vorgelegten Stopplösung gegeben.
- Jede Gruppe bereitet 2 Versuchsansätze (A und B) in schwarz verkleideten Rotdeckelröhrchen vor. In jedes dieser Gefäße werden 10 ml Algensuspension ( $E_{750} = 0,9$ ) eingefüllt.
- Danach je 1 ml MTT-Stammlösung zugeben und durch intensives Mischen (Vortex) die Reaktionskinetik starten

- Nun werden in 5-min-Intervallen insgesamt 8 Proben (Endzeit 40 min) mit je 0,8 ml Cyanobakteriensuspension entnommen und in die vorbereiteten Eppendorfgefäße mit der Stopplösung gegeben. Vor jeder Probenahme ist erneut intensiv zu mischen.
- **Ansatz B** werden nach der zweiten Probenahme 100 µl der Glucose-Stammlösung zugesetzt.
- Nach der letzten Probenahme werden die Eppendorfgefäße mindestens 10 min im Dunklen inkubiert.
- Proben für 5 min in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugieren
- Die klaren Überstände werden in Halbmikroküvetten überführt und bei 570 nm am Spektralphotometer gegen den Blindwert vermessen.

### **Auswertung**

Die Zunahme der Extinktion bei  $E_{570}$  der zwei Ansätze ist graphisch darzustellen.

Für die linearen Bereiche der Kurven sind die Anstiege zu berechnen.

Die MTT-Reduktionsraten der Ansätze A und B sind miteinander zu vergleichen, und die Ergebnisse sind zu diskutieren.

### **1.3. Transgennachweis durch PCR**

Für pflanzenphysiologische Untersuchungen werden heute häufig sogenannte transgene Pflanzen eingesetzt, in denen durch Gentransfer gezielt Fremdgene eingeführt worden sind. Diese Fremdgene werden i.d.R. durch Agrobakterien-vermittelten Gentransfer übertragen und enthalten bestimmte Markergene, um die transgenen von den Wildtyppflanzen zu unterscheiden. Bei solchen Markergenen kann es sich beispielsweise um Gene handeln, welche Resistenzen gegen Herbizide oder Antibiotika vermitteln. Vor der Verwendung derartiger Pflanzen muss der Genotyp überprüft werden, d.h. das Vorliegen der Fremdgene wird gezielt nachgewiesen. Das geschieht durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bei der mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase eine Ziel-DNA zwischen zwei Primersequenzen stark vermehrt ( $2^n$ ,  $n$  = Zahl der Zyklen), d.h. amplifiziert wird, so dass der Nachweis im Agarosegel möglich wird. Dieses Verfahren kann auch zum Nachweis gentechnisch veränderter Pflanzen in der Nahrung dienen.

#### **Untersuchungsobjekt:**

Kartoffel (*Solanum tuberosum*) Sorte Albatros, Wildtyp und transgene Linie

**Geräte:** Eppendorfzentrifuge, Thermocycler, automatische Pipetten, Elektrophoresekammer mit Stromversorger

#### **Durchführung**

Von den Pflanzen wird Blattmaterial (ca. 1x1 cm von möglichst jungen Blättern) abgenommen, in ein Eppendorfgefäß (1,5 ml) überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur DNA-Extraktion genutzt.

## 1. DNA-Isolation (je eine Kontroll- und transgene Pflanze pro Gruppe):

- Gefrorene Blätter mit Eppimörser gut zerkleinern
- 500 µl 2xCTAB-Puffer zugeben, Mischen durch vortexen
- Abzug + Handschuhe: 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalk. zugeben, mischen
- 5 min bei 13000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugieren
- Abzug + Handschuhe: Obere wässrige Phase in neues Eppendorfgefäß überführen
- Abzug + Handschuhe: 500 µl Isopropanol zugeben, mischen, 30 min bei -20°C fällen
- 15 min bei 13000 rpm abzentrifugieren und Überstand verwerfen
- 200 µl 70 %iges Ethanol auf das weißliche Pellet geben
- 5 min bei 13000 rpm abzentrifugieren
- Überstand verwerfen, Ethanolreste gut absaugen, Pellet trocknen (Heizblock)
- Pellet in 50µl H<sub>2</sub>O aufnehmen und vortexen

## 2. DNA-Fragmentherstellung durch PCR

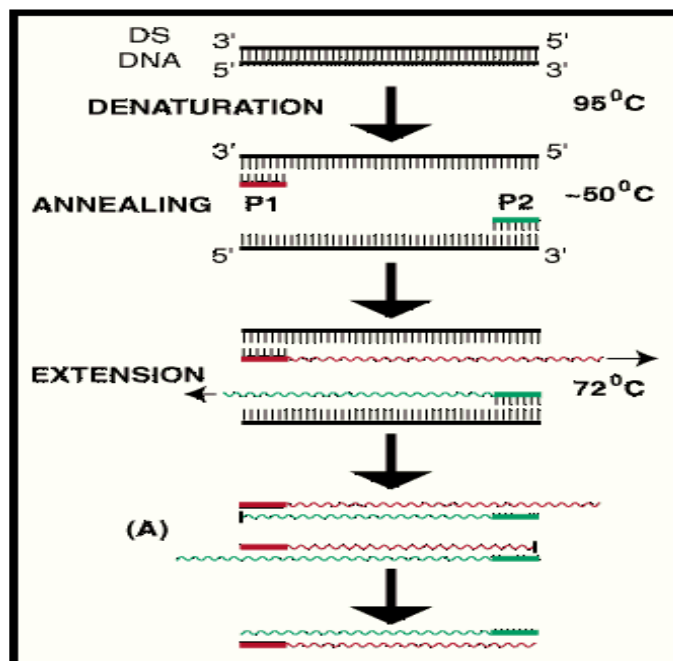


Abbildung 4: Schema PCR.

Aus der genomischen DNA werden nun durch PCR zwei spezifische Gensequenzen amplifiziert. Hierbei handelt es sich um ein Kanamycin-Resistenzgen (kan) für den Transgennachweis sowie das Gen, welches für die große ribosomale Untereinheit (60S) kodiert. Letzteres dient als Nachweis für den generellen Erfolg der DNA-Isolation.

Insgesamt setzt jede Gruppe 8 PCR-Reaktionen an, davon 4 mit dem Primerpaar für den Transgen-Nachweis sowie 4 mit dem Primerpaar für die DNA-Kontrolle. Für diese PCR-Ansätze werden folgende Templates eingesetzt:

1. DNA aus Wildtyp
2. DNA aus transgener Pflanze
3. Positivkontrolle für Transgennachweis
4. H<sub>2</sub>O

**Standard PCR-Ansatz:**

- 1 µl DNA
- 1 µl Primer A (bzw. forward)
- 1 µl Primer B (bzw. reverse)
- 2 µl H<sub>2</sub>O
- 5 µl Mastermix

---

10 µl Gesamtvolumen (für jedes Primerpaar wird ein Super-MasterMix angesetzt)

Der „Taq-Master-Mix“ der Firma „Qiagen“ enthält den notwendigen Puffer, die geeignete Mg<sup>2+</sup>-Konzentration von 1,5 mM, die dNTPs und die Taq-Polymerase. Das verwendete PCR-Programm richtet sich nach der Größe der erwarteten Fragmente. Daneben ist die konkrete Programmierung vom Typ des Thermocyclers und von anderen Reaktionsbedingungen (z.B. Mg<sup>2+</sup>-Gehalt des Puffers) abhängig.

**3. DNA-Gelelektrophorese (HANDSCHUHE AN!!!)**

Zur Trennung der in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente wird ein 1 %- Agarosegel hergestellt. Dieses enthält zur Färbung der DNA Ethidiumbromid (giftig, deshalb Handschuhe!).

Gel in entsprechend vorbereiteten Träger mit eingestecktem Kamm ca. 0,5 - 0,8 mm dick gießen und erkalten lassen. Nach ca. 30 min kann der Kamm vorsichtig aus dem verfestigten Gel gezogen werden.

Das Gel mit dem Träger in die Elektrophoresekammer legen. DNA wandert von der Kathode (-, schwarz) zur Anode (+, rot), also müssen die Geltaschen auf der Seite sein, an der der (-)-Pol angelegt wird.

Gel anschließend mit TAE-Puffer 2-3 mm überschichten.

PCR-Proben mit 2 µl 6x Loading Dye versetzen und in die Taschen pipettieren. Neben den PCR-Proben wird auch ein DNA-Größenstandard aufs Gel aufgetragen. Anschließend Spannung anlegen.

Gel abschalten, wenn die Bromphenolblau-Front den unteren Rand des Gels erreicht hat. DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar machen und Gel fotografieren.

Gelreste und Puffer sammeln und gesondert entsorgen, da diese Ethidiumbromid-haltig sind.

**Lösungen:**

Ethidiumbromid (giftig !!!): 10 mg/ml in TE, dunkel bei 4°C lagern

5 x TBE-Puffer:                    54 g Tris  
    27,5 g Borsäure  
    20 ml EDTA (0,5 M pH 8,0)  
    mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

5 x Stopplösung:                    0,1 M EDTA  
    40 % Glycerol  
    0,1 % SDS  
    0,025 % Bromphenolblau

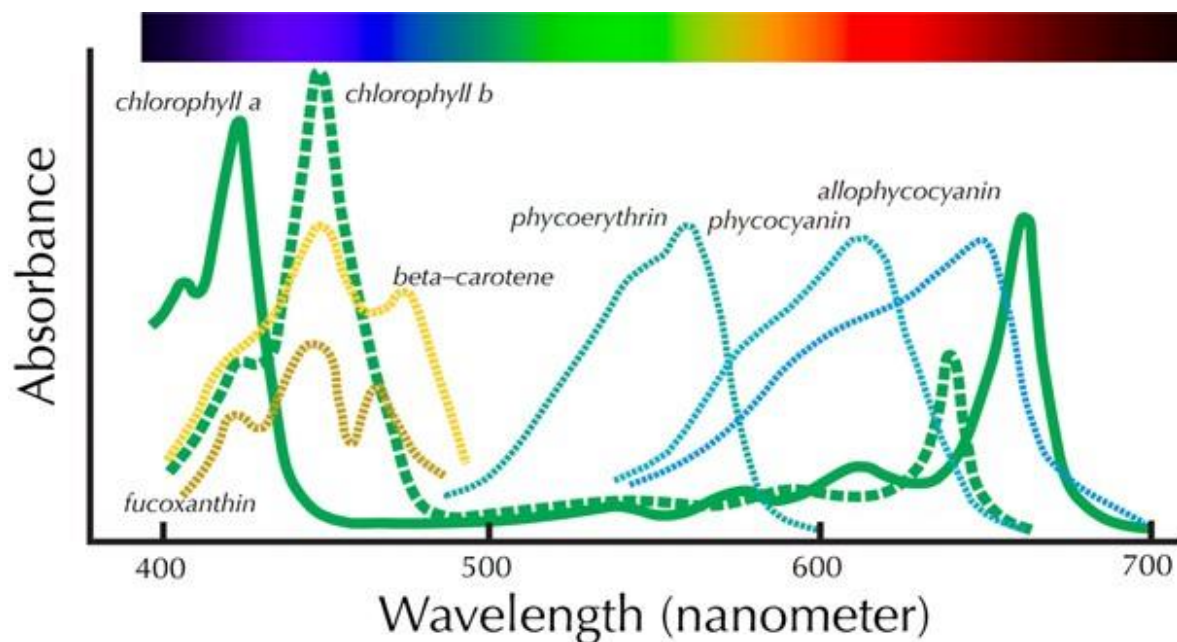
**Auswertung**

Das erhaltene Muster der DNA-Fragmente ist zu dokumentieren und bezüglich des Vorhandenseins von Fremdgenen unter Einbeziehung der Kontrollen zu diskutieren.

## Komplex 2 - Photosynthesepigmente

### 2.1. Absorptionsspektren, *in vivo* Pigmentkonzentrationen von Cyanobakterienkulturen

Der größte Teil der photosynthetisch aktiven Pflanzenpigmente ist bei der Lichtsammlung beteiligt, nur ein geringer Anteil des Chlorophyll a ist als Hauptpigment zur Ladungstrennung befähigt. Ihre quantitative Bestimmung in intakten Zellen (*in vivo*) ist bei einzelligen Cyanobakterien durch Lichtabsorptionsmessungen möglich. Je nach verwendetem Spektralphotometer können diskontinuierliche oder kontinuierliche Spektren aufgenommen werden. Bei bekannten Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  kann nach Extinktionsmessung in einer Küvette bekannter Schichtdicke die Konzentration einer gelösten absorbierenden Substanz berechnet werden (Lambert-Beersches Gesetz).



**Abbildung 4:** Absorptionsspektren der photosynthetischen Pigmente nach Isolation in organischen bzw. wässrigen Lösungsmitteln.

**Untersuchungsobjekt:** Cyanobakterienstamm *Synechocystis* sp. PCC 6803

#### **Materialien, Geräte**

Spektralphotometer (ca. 15 min vor der Messung anschalten!), 1 cm-Messküvette, Suspensionen von *Synechocystis*, Nährmedium, A. dest., Reagenzgläser, Pipetten

#### **Durchführung**

##### I. Kontinuierliche Spektren:

- am Spektralphotometer Programm für kontinuierliche Spektren aufrufen
- Küvette mit verdünnter Algensuspension füllen und gegen Küvette mit A. dest. als Blindwert messen
- entsprechend der Bedienungsanleitung des Gerätes die Messung durchführen

- Aufzeichnung des kontinuierlichen Spektrums mit dem am Spektralphotometer angeschlossenen Drucker, Ausdruck der Peaks (Wellenlänge und entspr. Extinktion)

II. Diskontinuierliche Messungen:

- Von der Algensuspension wird mit A. dest. eine definierte Verdünnung hergestellt (1 ml Suspension + 9 ml A. dest.), um in einem genauen Messbereich des Spektralphotometers zu gelangen.

- beifolgenden Wellenlängen sind die Extinktionen zu ermitteln: **750, 680, 625** und **490** nm. Es ist gegen A. dest. zu messen und die Werte sind zu notieren.

**Berechnung und Auswertung**

I. kontinuierliche Spektren: Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima sind den Peak-Listen zu entnehmen. Eine Zuordnung der Pigmente zu den aufgezeichneten Absorptionsmaxima ist nach der Abbildung 4 vorzunehmen.

II. diskontinuierliche Messung der Extinktionen:

Für die Berechnung der quantitativen Pigmentmengen sind folgende **3 Korrekturen** der Extinktionswerte notwendig:

**1. Korrektur:** Die Extinktionswerte von 680 nm (Chl a), 625 nm (Phycocyanin) bzw. 490 nm (Carotenoide) sind durch Abzug des E<sub>750</sub>-Wertes (Trübungswert) zu korrigieren. Da die Pigmente bei E<sub>750</sub> selbst nicht absorbieren, entspricht dieser Wert der unspezifischen Lichtabsorption in der Küvette.

**2. Korrektur:** Anschließend ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

**3. Korrektur:** Um Überlappungen der Absorptionskurven verschiedener Pigmente zu berücksichtigen, sind anschließend nach SIGALAT/de KOUCHKOWSKI (1975) folgende Korrekturen der Extinktionswerte vorzunehmen:

für Carotenoide (490 nm)

$$E_{490 \text{ kor3}} = 1,152 \times E_{490 \text{ kor2}} - (0,0244 \times E_{680 \text{ kor2}} + 0,0415 \times E_{625 \text{ kor2}})$$

für Phycocyanin (625 nm)

$$E_{625 \text{ kor3}} = 1,0114 \times E_{625 \text{ kor2}} - 0,2488 \times E_{680 \text{ kor2}}$$

für Chlorophyll a (680 nm)

$$E_{680 \text{ kor3}} = 1,0114 \times E_{680 \text{ kor2}} - 0,0465 \times E_{625 \text{ kor2}}$$

Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz kann bei bekannten Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) und einer Schichtdicke von  $d = 1 \text{ cm}$  die Pigmentkonzentration berechnet werden:

$$c \text{ (mol/l)} = \frac{E_{\text{kor3}}}{\epsilon \times d}$$

$$\epsilon_{680} = 103500 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{625} = 210000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{490} = 94500 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

-  $\text{M}^{-1}$  entspricht  $\text{mol}^{-1} \times \text{l}$

- Umrechnung der Pigmentkonzentrationen in  $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$
- Verhältniswerte der 3 Pigmente angeben (Chl a = 1)
- Vergleich der gefundenen Absorptionsmaxima eines Pigments im *in vivo* Spektrum mit dem im *in vitro* Spektrum des Methanolextraktes (siehe 2.2.) sowie dem im *in vitro* Spektrum des Phycocyaninextraktes (siehe 2.4.)

## 2.2. *In vitro* Chlorophyll-a-Gehalt: Vergleich Cyanobakterien mit höheren Pflanzen

Zur Extraktion der Pigmente müssen die Zellen abgetötet und mechanisch zerstört werden. Mit einem geeigneten Lösungsmittel (z.B. 90 % Aceton, Methanol) können sie dann extrahiert werden. Will man den Extrakt zu quantitativen Messungen verwenden, ist das Verhältnis Lösungsmittel zu Wasser genau zu beachten.

**Untersuchungsobjekte:** Cyanobakterienstamm *Synechocystis* sp. PCC 6803, Blätter von Hibiskus (höhere Pflanze)

### Materialien

Methanol, Aceton (90%ig),  $\text{CaCO}_3$ , gereinigter Quarzsand, Glasschliff, Mörser, Pistille, Trichter, Glasfaserfilter, Zentrifuge Sigma K30, Zentrifugengläser (50 ml), Filtriereinrichtung, Maßkolben 50 ml, Pipetten, Eppendorfgefäße, Waage

### Durchführung

#### a) Bestimmung der Frischmasse der Cyanobakterien

- Die "Leermasse" von 2 Eppendorfgefäßen (1,5 ml) wird zunächst mit Hilfe einer Feinwaage ermittelt.
- in jedes Eppendorfgefäß ist 1 ml der Cyanobakteriensuspension zu pipettieren
- 5 min Zentrifugation der Eppendorfgefäße bei 13.000 Upm
- **vollständiges** Absaugen des Überstandes mit der Pipette
- Auswiegen der Gefäße mit den Algenpellets
- Differenzbildung zur "Leermasse" zur Ermittlung der Frischmasse (FM)
- Berechnung des Durchschnittwertes, Angabe der FM in:  $\text{mg FM} \times \text{ml}^{-1}$

#### b) Extraktion von Chlorophyll a (Chla) aus Cyanobakterien

- 10 ml der Cyanobakteriensuspension über Glasfaserfilter absaugen (möglichst wasserfrei)
- Filter mit den Algen nach innen falten, in ein 50 ml Rotdeckelgefäß überführen,
- Zusatz von 10 ml Methanol (giftig!!!, Handschuhe)
- Dunkel stellen und alle 15 min gut umschütteln
- nach ca. 1 h Extrakte bei 5000 Upm abzentrifugieren
- Überstand in ein Reagenzglas überführen
- diesen Extrakt am Spektralphotometer in einer 1 cm-Küvette gegen Methanol messen:
  - I. kontinuierliches Spektrum
  - II. diskontinuierliche Messung bei 750 nm und 663 nm

## Berechnung und Auswertung

### Chl a - Cyanobakterien

$\epsilon$  von Chl a in Methanol, 663 nm = 79,2 L x g<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup> nach LICHTENTHALER (1987)

$$\text{Chl a (g x l}^{-1}\text{)} = \frac{(E_{663} - E_{750}) \text{ g x cm}}{79,2 \text{ L x 1 cm}}$$

- Umrechnung in mg x l<sup>-1</sup> = µg x ml<sup>-1</sup> Extrakt
- Umrechnung in µg x ml<sup>-1</sup> Algensuspension unter Berücksichtigung des eingesetzten Algenvolumens und des Methanolvolumens (Verdünnungsfaktor)
- Berechnung des Chl a-Gehalts unter Bezug auf die oben ermittelte Frischmasse (FM) in µg Chl a x mg<sup>-1</sup> FM

### c) Extraktion von Chl a und b aus der höheren Pflanze *Physalis o.ä.*

- 0,5 g Blattmasse abwiegen
- im Mörser unter Zusatz von Quarzsand, einer Spatelspitze CaCO<sub>3</sub> und 1 ml Aceton (90 %ig) fein zerreiben
- Brei in ein Rotdeckelröhrchen (50 ml) überführen, dabei Mörser, Pistille mindestens 3mal mit 5 bis 10 ml Aceton spülen (bis alle grüne Farbe aus dem Mörser extrahiert ist)
- abzentrifugieren (3 min, 5000 U/min), Überstand in einen 50 ml Maßkolben durch wiederholtes Pipettieren quantitativ überführen
- Maßkolben mit 90 %igem Aceton bis zum Eichstrich (50 ml) auffüllen.
- diesen Pflanzenextrakt am Spektralphotometer in einer 1 cm Küvette gegen Aceton messen (Aceton macht die Küvetten trübe, daher schnell messen!):
  - I) kontinuierliches Spektrum
  - II) diskontinuierliche Messung bei 750, 647 bzw. 663 nm.

## Berechnung und Auswertung

Formeln nach JEFFREY/HUMPHREY unter Berücksichtigung der  $\epsilon$  von Chlorophyllen in Aceton zur Berechnung der Chl a - bzw. Chl b - Gehalte:

$$\text{Chl a (}\mu\text{g x ml}^{-1}\text{)} = 11,8 \times (E_{663} - E_{750}) - 2,3 \times (E_{647} - E_{750})$$

$$\text{Chl b (}\mu\text{g x ml}^{-1}\text{)} = 20,1 \times (E_{647} - E_{750}) - 4,8 \times (E_{663} - E_{750})$$

- Die Gehalte an Chl a und Chl b sind unter Berücksichtigung der eingesetzten Frischmasse (FM) und des Acetonvolumens auf µg Chl a (bzw. Chl b) x mg<sup>-1</sup> FM umzurechnen (Verdünnung bzw. Mengenverhältnisse mit Einheiten beachten!).

### 2.3. Dünnschichtchromatographische Trennung von Pigmenten -Vergleich Cyanobakterien-höhere Pflanzen

Mittels Verteilungschromatographie an Kieselgel G -Dünnschichtplatten gelingt eine schnelle qualitative Auftrennung von Pigmentextrakten. Die Hauptunterschiede in der Pigmentverteilung bei unterschiedlichen Organismen können erfasst werden. Das Prinzip

dieser Chromatographie besteht darin, dass während des Trennprozesses eine mobile (strömende) Phase in einer Richtung durch eine stationäre (unbewegliche) Phase transportiert wird. Während des Laufes findet ein kontinuierlicher Substanztausch zwischen mobiler und stationärer Phase statt, welcher zu einer Verlangsamung (Retention) der einzelnen Substanzen in Bezug auf die Strömungsgeschwindigkeit des Laufmittels führt. Die Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit verschiedener Substanzen können als sogenannter  $R_f$ -Wert gemessen werden:

$R_f = \frac{\text{Wanderungstrecke der Substanz}}{\text{Wanderungstrecke der Laufmittelfront}}$ .

Bei streng standardisierten Chromatographiebedingungen können sie zur Charakterisierung und analytischen Identifizierung von Substanzen dienen. Die erfolgreiche Auftrennung farbiger Probengemische ist leicht zu erkennen. Farblose Moleküle erfordern dagegen spezielle Nachweisverfahren, die meist direkt auf den DC-Platten durchgeführt werden.

#### **Materialien:**

Konzentrierte Pigmentextrakte von Pflanzen und Cyanobakterien, DC-Platten mit Kieselgel, Trennkammer, Laufmittel: Benzin/Isopropanol/Wasser 100/10/0,25, Mikropipette, Fön,

**Durchführung:** Das Laufmittel wird in die Kammer gegossen und die Kammer mit dem Deckel verschlossen (Sättigung des Kammervolumens mit Laufmitteldämpfen). Unterschiedliche Volumina der Pigmentextrakte (100-200  $\mu$ l) werden in 2 cm Abstand vom unteren Rand (Startlinie) in Streifen von ca. 1 cm Länge aufgetragen. Zwischen den aufgetragenen Pigmentzonen Zwischenräume von 0.5 bis 1 cm lassen. Die Trägerschicht darf nicht verletzt werden. Zum schnellen Abtrocknen der aufgetragenen Extrakte mit einem Fön trocknen. Die getrockneten und beschrifteten DC-Platten in die Kammer stellen.

Wenn die Laufmittelfront ca. 2 cm unter dem oberen Rand angelangt ist, DC-Platten herausnehmen und schnell auf der feuchten Platte die gefärbten Banden protokollieren.

**Auswertung:** Zuordnung der Pigmente: Reihenfolge der Banden: Startlinie, Neoxanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin, Lutein und Zeaxanthin, Chlb, Chla, Phaeophytin, Carotin, Laufmittelfront.

Laufmittelfront und die Zonen der einzelnen Pigmente sofort auf der Platte markieren, Vergleich des Pigmentspektrums vom Cyanobakterienextrakt mit dem Calla-Extrakt.

#### **2.4. *in-vitro*-Bestimmung des Phycocyaningehaltes in Cyanobakterienextrakten**

Phycocyanine sind wasserlösliche Pigmente, deren chromophore Gruppen kovalent an Proteine gebunden sind. Nach Zerstörung der Zellstrukturen können sie als Phycocyanin-Proteinkomplexe mit Wasser bzw. Pufferlösungen extrahiert werden.

**Untersuchungsobjekt:** Cyanobakterienstamm *Synechocystis* sp. PCC 6803

#### **Materialien, Geräte**

Zentrifuge Sigma 3K30, Ultraschallspitze, 15 ml Rotdeckelgefäße, Homogenisationspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,3)

### Durchführung

15 ml Cyanobakteriensuspension werden in einem 15 ml Röhrchen abzentrifugiert (5000 U/min, 5 min). Der Überstand wird vollständig verworfen. Das Pellet ist in 150 µl Homogenisationspuffer zu resuspendieren. Diese Zellsuspension wird im Eisbad zweimal 1 min (dazwischen 1 min Pause) mit der Ultraschallspitze bei 30 Watt behandelt. Die Spitze wird anschließend mit 150 µl Homogenisationspuffer gespült. Die Homogenate werden ausgeglichen und 60 min in der Sigma-Zentrifuge bei 14.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der resultierende Überstand repräsentiert die Fraktion der löslichen Proteine einschließlich der Phycocyanin-Proteinkomplexe, das Pellet die Membranfraktion.

Der Überstand ist vorsichtig mit einer Pipette abzunehmen und in ein Reagenzglas zu überführen. Es werden 5 ml A. dest. zugegeben und gegen A. dest. vermessen:

- I) kontinuierliches Spektrum
- II) diskontinuierliche Messung bei 750, 680 bzw. 625 nm.

### Berechnung und Auswertung

- Korrektur der Extinktionswerte  $E_{680}$  bzw.  $E_{625}$  durch Subtraktion von  $E_{750}$   
 $1,016 \times E_{625k} - 0,203 \times E_{680k}$

- PC-Gehalt (mol/l im Messansatz) =  $\frac{\text{Extinktionswert}}{210\,000 \times 1 \text{ cm}}$

\*  $\epsilon$  für PC in wässriger Lösung =  $210\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

- Der erhaltene Wert ist in µmol pro l Algensuspension unter Berücksichtigung des eingesetzten Cyanobakterienvolumens und der Verdünnung durch Puffer und A.-dest.-Zugabe (Verdünnungsfaktor) umzurechnen.

### Folgende Vergleiche sind anzustellen und zu diskutieren:

- Vergleich des *in vivo* bestimmten Chl a-Gehaltes der Cyanobakterien (µmol/ml) mit dem *in vitro* ermittelten Wert (µg/ml): Dazu ist es erforderlich, beide Ergebnisse in eine identische Einheit umzurechnen. Da die Molekülmasse (Chl a = 893 g/mol) von Chlorophyll a bekannt ist, ist das leicht möglich.
- Vergleich des *in vitro* bestimmten Chl a-Gehaltes der Cyanobakterien mit dem einer höheren Pflanze (Hibiskus) auf der Basis von µg Chl a/mg FM
- Vergleich des *in vitro* bestimmten Chl a-Gehaltes mit dem Chl b-Gehalt bei Calla (µg Chl a bzw. Chl b/mg FM)
- Vergleich des *in vitro* sowie *in vivo* ermittelten PC-Gehalt (µmol/l)

## **Komplex 3 – Ionen und osmotisches Potential bei Pflanzen**

Pflanzen unterscheiden sich in ihrer Salztoleranz. Die Mehrzahl der Pflanzen ist sehr empfindlich gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen im Boden und wird als Glykophyten bezeichnet. Dagegen sind Halophyten an salzhaltige Standorte angepasste Pflanzen. Dem niedrigen osmotischen Potential des Bodens begegnen sie mit einer Akkumulation von NaCl in der Vakuole und osmoprotektiven Substanzen im Cytoplasma. Da die Vakuole ein Vielfaches des Cytoplasmavolumens ausmacht, bestimmt ihr Inhalt im Wesentlichen die Zusammensetzung des Presssaftes. Durch einen Vergleich der Presssäfte eines Halophyten mit einem Glykophyten lässt sich die salzbedingte Änderung im Ionengehalt und osmotischen Potential leicht nachweisen.

**Untersuchungsobjekte:** Glykophyt: Raps (*Brassica napus*) und Halophyt: Salzmiere (*Honckenya peploides*)

### **Herstellung der Presssäfte - Materialien, Geräte**

Pflanzenpresse, Zentrifugenröhrchen

Blätter von Glykophyten und Halophyten werden mit Hilfe einer Pflanzenpresse ausgepresst. Der Presssaft wird in je einem 15 ml Falcon aufgefangen. Zur Entfernung der Pflanzenteile muss der Presssaft zentrifugiert werden (10 min, 14.000 U/min, 4°C, Sigma 3K3). Der Überstand wird behutsam mit einer Pipette abgezogen und in ein sauberes 15 ml Falcon überführt. Der so gewonnene Presssaft dient zur Bestimmung des

1. Cl<sup>-</sup>-Gehaltes (Titration 3.1.)
2. der K<sup>+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Konzentrationen (Flammenphotometer, 3.2.)
3. der osmotischen Konzentration (Osmometer, 3.3).

Für die Bestimmung am Flammenphotometer und am Osmometer muss ein Teil des Presssaftes erneut zentrifugiert werden, um evtl. noch vorhandene Zellbruchstücke zu entfernen. Dazu werden insgesamt 4x 1 ml (2x Halophyt, 2x Glykophyt) der jeweiligen Presssäfte in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und in der Eppendorfsentrifuge mit maximaler Drehzahl für 10 min zentrifugiert. Die klaren Überstände werden anschließend sofort in saubere 1,5 ml Eppendorfgefäße (2x Halophyt, 2x Glykophyt) überführt und für die oben genannten Messungen eingesetzt.

### **3.1. Chloridbestimmung in Presssäften durch Titration mit Silbernitrat**

Presssaftchloride werden mit Silbernitrat (AgNO<sub>3</sub>, giftig! bitte Handschuhe anziehen) unter Verwendung von Alkalichromat (K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>) als Indikator titriert. Dabei fällt zunächst AgCl aus, so dass die Lösung trüb wird. Ist kein Chlorid mehr in der Lösung bildet überschüssiges Ag<sup>+</sup> mit dem Chromat einen schwerlöslichen, rotbraunen Ag<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>-Komplex aus, welcher den Umschlagpunkt der Titration kennzeichnet.

**Material:** 0,01 M AgNO<sub>3</sub>, 0,01 M NaCl, 5 % K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>-Lösung, Presssaft von Glyko- und Halophyten, Bürette, 4 Erlenmeyerkolben

### Durchführung

Folgende Ansätze sind zu machen:

- a) Blindwert  
100 ml A. dest.
  - b) 1 ml Glykophytensaft  
auf 100 ml mit A. dest. auffüllen
  - c) 0,5 ml Halophytensaft  
auf 100 ml mit A. dest. auffüllen
  - d) Titerbestimmung (F)  
10 ml 0,01 M NaCl auf 100 ml  
mit A. dest. auffüllen
- + je 1 ml K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>-Lösung

Beginnend mit der Titerbestimmung (Ansatz d) werden nacheinander alle Ansätze mit Silbernitrat bis zum Farbumschlag titriert. Dabei wird der Erlenmeyerkolben ständig leicht geschwenkt. Zu Beginn wird der Farbumschlag anhand der nicht titrierten (gelben) Lösungen bestimmt. Anschließend ist darauf zu achten, dass alle Ansätze den gleichen Farbumschlag zeigen.

### Berechnung und Auswertung

Der Blindwert (für Ansatz a) verbrauchte ml an AgNO<sub>3</sub>) ist vor der Berechnung von den Volumina der Ansätze b), c) und d) zu subtrahieren.

Der Eichfaktor (Ansatz d)) wird wie folgt bestimmt:

$$\text{Eichfaktor der AgNO}_3\text{-Lösung, } F = \frac{10 \text{ ml NaCl}}{x \text{ ml AgNO}_3}$$

Der Chloridgehalt in den Presssäften ist anschließend nach folgender Formel zu berechnen:

$$\text{Cl}^- \text{ (M)} = \frac{V_T \times F \times C_e}{V}$$

V<sub>T</sub> - Volumen der zur Titration verbrauchten AgNO<sub>3</sub>-Lösung (ml, siehe b) bzw. c) nach Abzug des Blindwertes a))

F - Eichfaktor

C<sub>e</sub> - Konzentration der AgNO<sub>3</sub>-Lösung in M

V - eingesetztes, unverdünntes Probevolumen (ml)

Nach Umrechnung der Konzentration in mM werden die Cl<sup>-</sup>-Gehalten in Glyko- und Halophytensaft vergleichend diskutiert.

### 3.2. Bestimmung der Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Konzentration in Presssäften mit Hilfe der Flammenphotometrie

Gelöste Alkali- oder Erdalkalisalze werden nach Zerstäuben in eine starke, entleuchtete Flamme eingeblasen. Dort erzeugen sie (konzentrationsabhängig) eine ihren Spektrallinien entsprechende Flammenfärbung. Die Spektrallinie des betreffenden Metalls wird durch einen Interferenzfilter herausgefiltert und die Lichtstärke mittels Photozelle und Galvanometer gemessen. Aus vorher aufgestellten Eichkurven wird dann der Ionengehalt ermittelt.

**Geräte:** Flammenphotometer mit Zubehör, KCl- bzw. NaCl-Eichlösung (gemeinsame Eichlösung für Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup>: 100 µM NaCl und 200 µM KCl), Presssäfte von Glyko- und Halophyten, Mikropipetten, 50 ml Falcons (10 Stk.)

#### Durchführung

Inbetriebnahme des Gerätes: siehe Bedienungsanleitung JENWAY PFP7

**Vorsicht vor der heißen Flamme am Gerät!**

#### Aufstellen der Eichkurve

Es sind 6 Eichansätze aus der Stammlösung und A. dest. anzusetzen (siehe Tabelle), die entsprechend der Bedienungsanleitung am Flammenphotometer vermessen werden.

Stammlösung: 100 µM NaCl, 200 µM KCl

Eichansätze:

| Nr. | ml Stammlösung | ml A. dest. | Konz. Na <sup>+</sup> (µM) | Konzentr. K <sup>+</sup> (µM) |
|-----|----------------|-------------|----------------------------|-------------------------------|
| 1   | 4              | 36          |                            |                               |
| 2   | 8              | 32          |                            |                               |
| 3   | 16             | 24          |                            |                               |
| 4   | 24             | 16          |                            |                               |
| 5   | 32             | 8           |                            |                               |
| 6   | 40             | -           | 100                        | 200                           |

#### Messung der Presssäfte

Die Presssäfte müssen sofort nach Vermessen der Eichwerte analysiert werden. Dazu sind die Presssäfte mit A. dest. zu verdünnen (Halophyten: 1:5000 und 1:1000; Glykophyten: 1:500 und 1:100). Die verdünnten Presssäfte sind dazu mit an das Gerät zu nehmen.

#### Berechnung und Auswertung

Mit Hilfe der Konzentrationen an K<sup>+</sup> bzw. Na<sup>+</sup> in den 6 Eichansätzen (x-Werte) und den dazugehörigen Messwerten (y-Werte) wird am Computer (Excel Programm) die Eichfunktion berechnet. Mit Hilfe der berechneten Funktionen sind die Kationenkonzentrationen für die verdünnten Presssäfte zu berechnen. Anschließend werden unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren die tatsächliche K<sup>+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Konzentration der puren Presssäfte (in mM) berechnet. Die Ergebnisse sind vergleichend für die beiden Ionen und Pflanzentypen zu diskutieren.

### 3.3. Bestimmung der osmotischen Konzentration in Presssäften mit Hilfe des Gefrierpunktsmometers

Die Osmolalität (Mol gelöster Teilchen pro kg Wasser, osmol/kg) eines klaren Presssaftes lässt sich sehr genau mit einem Gefrierpunktsmometer messen. In diesem Gerät wird eine Mikroprobe der Lösung (in welche ein Thermofühler ragt) durch PELTIER-Kühlung langsam abgekühlt. In Abwesenheit von Kristallisationskeimen bleibt die Probe auch unterhalb des Gefrierpunktes zunächst flüssig (unterkühlte Lösung). Dann setzt die Kristallisation entweder spontan ein oder kann durch Vibration der Probe initiiert werden. Die Temperatur steigt durch Freisetzung von Kristallisationswärme schlagartig auf den exakten Gefrierpunkt an. Dieser steht in einem direkten Zusammenhang mit der Osmolalität (1 osmol/kg führt zu einer Gefrierpunktniedrigung gegenüber reinem Wasser um 1,858°C).

Mit Hilfe der van't Hoff'schen Gleichung (gilt für stark verdünnte Lösungen) kann man das osmotische Potential  $\psi_s$  abschätzen:

$$\psi_s = -\Sigma c RT$$

R-Gaskonstante (0,0083 L x MPa/mol x K)

T- absolute Temperatur in Kelvin (K), bei 0°C = 273 K

$\Sigma c$  - Summe der Konzentrationen aller Teilchenarten in der Lösung, ausgedrückt als Molarität (Mol gelöster Substanz pro Liter Wasser, mol/l)

- vereinfacht wird Molarität (mmol/l)  $\approx$  Osmolalität (mosmol/kg) gesetzt, d. h. der berechnete Osmometer-Wert, (mosmol/kg) ist in diese Formel einzusetzen.

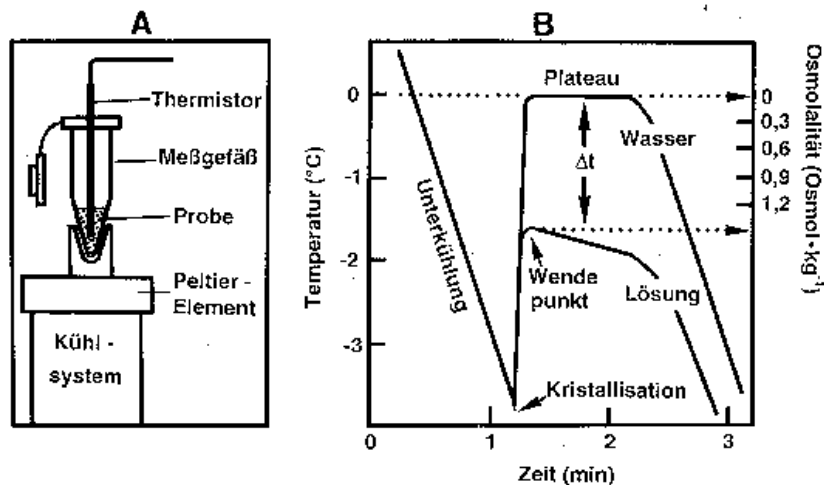


Abbildung 5: Aufbau (A) und Messprinzip (B) des Gefrierpunktsmometers.

**Untersuchungsobjekt:** Presssäfte von Glykophyt und Halophyt

**Materialien/Geräte:** Eppendorfgefäße und -zentrifuge, Mikropipetten, KNAUER-Osmometer und NaCl Eichlösung (200 mmol/l  $\approx$  400 mosmol/l  $\approx$  400 mosmol/kg)

#### Durchführung (s. Bedienungsanleitung)

Mit Hilfe von A. dest. und einer definierten NaCl-Lösung (400 mosmol/l) wird das Gerät geeicht. Mit einer Mikropipette werden anschließend 150  $\mu$ l des Presssaftes in die Küvette des Osmometers eingefüllt (Presssaft muss völlig klar und partikelfrei sein, blasenfrei einfüllen). Am Osmometer wird diese Lösung bei Verstärkung 64 so lange unterkühlt, bis der Zeiger den Wert von ca. 60 erreicht. Durch kurzes Vibrieren wird ein

schlagartiges Gefrieren des Presssaftes bewirkt, das sich in einer schnellen Bewegung des Zeigers in Richtung Nullpunkt ausdrückt (Freiwerden der Gefrierwärme). Durch Verstellen des Verstärkerknopfes auf die Stufe 8 wird der Zeiger etwa in der Mitte der Skala fixiert und der niedrigste Wert abgelesen. Der abgelesene Wert und die eingestellte Verstärkung werden protokolliert. Diese Messung wird mindestens zweimal mit neuem Pflanzensaft wiederholt.

### **Berechnung und Auswertung**

1. Die osmotische Konzentration in den Presssäften wird unter Berücksichtigung des Eichfaktors\* nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Osmotische Konzentration (mosmol/kg)} = \text{Skalenteile} \times \text{Verstärkung} \times F_{\text{Eichwert}}^*$$

$$* F_{\text{Eichwert}} = \frac{\text{Theoretische Osmolalität der Eichlösung (400 mosmol/kg)}}{\text{gemessene Osmolalität der Eichlösung (Skalenteile} \times \text{Verstärkung)}}$$

Die so berechneten osmotischen Konzentrationen sind unter der vereinfachten Annahme, dass die gemessene Osmolarität  $\text{mosmol/kg} \approx \text{mmol/l}$  in etwa der Konzentration niedermolekularer Teilchen entspricht, mit der Summe der Konzentrationen von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  [siehe 3.2] und  $\text{Cl}^-$  [siehe 3.1.] zu vergleichen. Der prozentuale Anteil dieser Ionen an der osmotischen Konzentration (Osmometer misst die Summe aller gelösten Teilchen) ist zu berechnen und das Ergebnis ist zu diskutieren. Zusätzlich ist mit Hilfe der van't Hoff'schen Gleichung (siehe oben) das sich aus der osmotischen Konzentration aller Teilchen (Osmometer-Werte) ergebende osmotische Potential  $\psi_s$  zu berechnen und zu diskutieren.

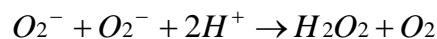
Hinweise zum Protokoll:

- es ist eine Einleitung und Auswertung für den Gesamtkomplex zu formulieren
- die Messprinzipien sollten zu jedem Versuch kurz erläutert werden
- alle Abbildungen, Diagramme (unterhalb) und Tabellen (oberhalb) sind zu beschriften
- in die Diagramme ist eine Achsenbeschriftung (inkl. Einheiten) einzufügen
- alle Rohdaten sind zu protokollieren
- Rechenwege sind detailliert aufzuschreiben (inkl. Einheiten)

## Komplex 4 – Molekulare Pflanzenphysiologie

### 4.1. Nachweis der Superoxid Dismutase (SOD) in Pflanzenextrakten

Das Enzym Superoxid Dismutase (SOD) kommt in vielen Organismen vor. In photosynthetischen Organen, insbesondere in den Chloroplasten der Pflanzen spielt es eine wichtige Rolle, da im Verlauf der Photosynthese besonders unter Starklichtbedingungen Elektronen auch auf Sauerstoff übertragen werden können, wodurch gefährliche Sauerstoffradikale entstehen. Die SOD dient dort dem Schutz vor toxischen Sauerstoff- Verbindungen, indem es folgende Reaktion katalysiert:



Innerhalb eines Organismus gibt es von Organell zu Organell verschiedene Superoxid Dismutasen. Auch zwischen den Arten unterscheiden sich die SOD in ihrem Aufbau. Damit stellt die Analyse von SOD eine Möglichkeit zur Charakterisierung von Arten dar und wird hierzu häufig eingesetzt. Der Enzymnachweis erfolgt indirekt, da das Substrat von SOD instabil ist. Der Enzymnachweis basiert auf folgenden Reaktionen: Riboflavin produziert  $O_2^-$ , welches dann das leicht gelbliche „nitro blue tetrazonium“ (NBT) zu grau-blau erscheinendem „blue formazan“ reduziert. SOD verhindert durch den Abbau des Sauerstoffradikals die Reduktion von NBT, weshalb eine Farbveränderung zu graublau ausbleibt.

**Ziel:** Das Ziel des Versuches besteht in der Isolierung und Auftrennung von SOD aus Pflanzenblättern (Kartoffel und Erbse). Dazu werden Blattextrakte hergestellt und die erhaltenen Proteinextrakte mittels nativer diskontinuierlicher Gelelektrophorese aufgetrennt. Neben dem speziellen Nachweis für SOD werden andere Proteine in den hergestellten Extrakten über Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blue sichtbar gemacht.

#### **Durchführung:**

##### **A – Gelherstellung – Handschuhe!!!**

**Geräte:** Gießvorrichtung, Pipetten, Bechergläser

**Reagenzien:** Acrylamid-Stammlösung (Gift!!, 30%); 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% Ammoniumpersulfat (APS); TEMED; A. dest.

##### **Versuchsbeschreibung:**

1. Reinigung von vier Glasplatten (2 mit und 2 ohne Spacer) mit A. dest. und 70%igem Ethanol
2. Spacerplatte und Deckplatte werden in die entsprechende Halterung eingespannt
3. Trenngel-Lösung wird in den Zwischenraum bis ca. 1,5 cm unter den oberen Rand der kürzeren Glasscheibe pipettiert
4. Ansatz des **Trenngels:**
  - 5,0 ml Acrylamid Stammlösung (giftig – Handschuhe)
  - 9,7 ml A. dest.
  - 5,0 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
  - 40 µl APS
  - 40 µl TEMED

Achtung: Nach Zugabe von APS und TEMED polymerisiert das Gel und muss deshalb **zügig** in die Gießvorrichtung gegeben werden!

5. Anschließend wird das Trenngel zum Schutz vor Luft und Austrocknung vorsichtig mit A. dest. überschichtet
6. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wird die Wasserschicht durch Abgießen entfernt, Wasserreste mit saugfähigem Papier entfernen
7. Ansatz des **Sammelgels**:
  - 650 µl Acrylamid Stammlösung (giftig – Handschuhe)
  - 3,05 ml A. dest.
  - 1,25 ml Tris-HCl, 0,5 M, pH 6,8
  - 25 µl APS
  - 10 µl TEMED
8. Einfüllen des Sammelgels bis zum Rand der kürzeren Glasscheibe, luftblasenfreies Einsetzen der Kämme zum Formen der Geltaschen

### **B - Herstellung der Pflanzenextrakte**

**Materialien:** Blätter von Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und Erbse (*Pisum sativum*)

**Geräte:** Reibeschale, Eppendorfgefäße, Pipetten, Zentrifuge

**Reagenzien:** Extraktionspuffer (75 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1,5 mM EDTA, pro ml vor Gebrauch Zusatz von 50 µl PMSF – 5,23 mg in 2 ml Isopropanol - und 50 µl Pefabloc/Natriumhydrogensulfit-Lösung – 1,44 mg Pefabloc in 1 ml A. dest. mit 7,56 mg Natriumhydrogensulfit in 1 ml A. dest.), Bromphenolblau

#### **Durchführung:**

1. vom bereitgestellten Blattmaterial wird ca. 0,4 g abgewogen
2. Blattmaterial mit Schere zerkleinern und gründlich im eisgekühlten Mörser zerreiben
3. 1 ml des bereitgestellten Extraktionspuffers hinzufügen und nochmals gründlich zerreiben (Es sollten keine Luftblasen entstehen!)
4. Extrakt in ein beschriftetes Eppendorfgefäß (Gruppennummer, Pflanze) überführen und auf Eis lagern
5. mit dem zweiten Blattmaterial analog verfahren (Schere und Mörser vorher gründlich reinigen, um Verfälschungen zu vermeiden)
6. Extrakte bei 13.000 Umdrehungen für 5 min bei 4°C zentrifugieren
7. 500 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführen
8. 200 µl Probenpuffer (enthält Saccharose und Bromphenolblau) hinzufügen und mischen (Gefäß vorsichtig 3x drehen) Eppendorfgefäß weiter auf Eis lagern

### **C – Gelelektrophorese**

**Geräte:** Pipette, Gelkammer, Stromversorger

**Reagenzien:** 1 x Laufpuffer

**Durchführung:**

1. Gele in Elektrophoresekammer einspannen und diese mit Laufpuffer füllen
2. Kämme ziehen
3. je 5, 10 und 20 µl der Extrakte in die Geltaschen einfüllen (beide Gele werden identisch mit den Proben von Kartoffel- sowie Erbsenextrakten beladen, zwischen den Erbsen- und Kartoffelproben eine Bahn freilassen, auch Randspuren freilassen)
4. Reihenfolge notieren!
5. Stromversorger anschließen, Elektrophorese zunächst bei konstant 75 V laufen lassen
6. nach ca. 10 min auf konstant 130 V erhöhen (Die Gelelektrophorese ist beendet, wenn die blau markierte Lauffront das Gelende erreicht hat)

**D) Nachweis der Proteine**

**Reagenzien:** Coomassie R250; NBT – Lösung (16 mg NBT in 100 µl A. dest. und 700 µl Dimethylformamid lösen); 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8; Riboflavin (3 mM Riboflavin in A. dest.); TEMED

**Durchführung:**

1. mittels Spatel vorsichtig je 1 Glasplatte abheben
2. 1. Gel herausnehmen und in Plastikschaale mit bereitgestellter Coomassie-Lösung überführen (Gel wird 20 min angefärbt und danach in 10%iger Essigsäure-Lösung entfärbt, alternativ 5 min in A.dest. in Mikrowelle kochen)
3. 2. Gel herausnehmen und in Plastikschaale mit 20 ml K-Phosphatpuffer spülen, Puffer abgießen
4. SOD-Färbelösung (20 ml KPO<sub>4</sub>-Puffer mit 200 µl NBT-Lsg.) einfüllen
5. 20 min in SOD-Färbelösung inkubieren
6. SOD-Färbelösung entfernen und anschließend das 2. Gel mit 200 µl Riboflavin sowie 60 µl TEMED in 20 ml K-Phosphatpuffer überschichten
7. nach Färbung Gel mit A. dest. spülen
8. Gel belichten und zusätzlich mit UV-Lampe bestrahlen
9. Färbungen protokollieren
10. Gel trocknen oder einschweißen

**E) Auswertung:**

Was beobachten Sie?

Beurteilen Sie die beiden Nachweismethoden nach Ihrer Güte für den SOD Nachweis!

Nach welchen Eigenschaften werden Proteine bei der nativen Gelelektrophorese aufgetrennt?

Welches Enzym wird bei der Färbung mit Coomassie als dicke Bande sichtbar?

#### **4.2. Induktion von amylolytischer Aktivität im Endosperm der Gerstenkaryopse durch einen niedermolekularen Faktor (Gibberellin) aus dem keimenden Embryo**

Das Endosperm von Gräserkaryopsen enthält große Mengen Stärke, die bei der Keimung hydrolysiert wird. Als Abbauprodukt entsteht das Disaccharid Maltose, welches zur Ernährung des Embryos dient. Diese Speicherstoffmobilisierung wird durch ein hormonales Signal (Gibberellin) ausgelöst. Dieses wird im Embryo gebildet und induziert in den Aleuronzellen des Endosperm die Synthese des stärkeabbauenden Enzyms  $\alpha$ -Amylase. Die Bildung und Wirkungsweise dieses hormonalen Signals wird mit Hilfe eines Agar-Diffusionstests demonstriert. Der embryohaltige Teil der Karyopse scheidet einen stofflichen Faktor aus, der im embryofreien Teil der Karyopse die  $\alpha$ -Amylaseaktivität (Stärkeabbau) induziert. Als Substrat werden stärkehaltige Agarplatten eingesetzt, denen zur Hemmung des Bakterien- und Pilzwachstums Antibiotika zugesetzt werden. Der Nachweis der amylolytischen Aktivität erfolgt durch Anfärben der unverbrauchten Stärke durch die Jodstärkereaktion.

**Untersuchungsobjekt:** Gerste-*Hordeum vulgare*

##### **Durchführung:**

Herstellung der Testplatten (werden bereitgestellt):

- a) stärkehaltiges Agarmedium: 1g Agar, 200 mg lösliche Stärke, 100 mg  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  in 100 ml A. dest. lösen und autoklavieren. Anschließend Zugabe von Antibiotika (sterile Stammlösungen von Streptomycinsulfat 0,5 mg/100 ml bzw. Cycloheximid 10  $\mu\text{g}$ /100 ml).
- b) stärkehaltiges Agarmedium wie unter a) mit Zusatz von 1  $\mu\text{M}$  Gibberellinsäure ( $\text{GA}_3$ , Endkonzentration).

Jede Gruppe erhält insgesamt 4 mit stärkehaltigem Agarmedium gefüllte Testplatten: davon enthalten 2 keine Gibberellinsäure ( $-\text{GA}_3$ ) und 2 Schalen enthalten Gibberellinsäure ( $+\text{GA}_3$ ). Für den Test werden insgesamt 12 embryohaltige ( $+\text{Embryo}$ ) und 12 embryofreie ( $-\text{Embryo}$ ) Halbkaryopsen (HK) benötigt. Dazu werden 18 Gerstenkaryopsen mit einem Skalpell durch einen medianen Querschnitt in eine embryohaltige und eine embryofreie Hälfte gespalten. Die Halbkaryopsen werden zur Oberflächensterilisation für 2 min in einer NaOCl-Lösung (0,5 % wirksames Chlor) inkubiert, mit sterilem (abgekochtem Wasser) zweimal gewaschen, auf Filterpapier abgetupft und anschließend mit der Schnittfläche direkt auf die Agarflächen aufgesetzt:

1.  $-\text{GA}_3$ -Platte mit 6 embryohaltigen HK;
  2.  $-\text{GA}_3$ -Platte mit 6 embryofreien HK
  3.  $+\text{GA}_3$ -Platte mit 6 embryohaltigen HK; bzw. 4.  $+\text{GA}_3$ -Platte mit 6 embryofreien HK
- belegen.

Die Platten werden bei 24°C im Brutschrank für 24-48 h inkubiert.

Der Kontakt zwischen Schnittfläche und Agar muss während der gesamten Inkubationszeit erhalten bleiben; daher müssen evtl. auswachsende Wurzeln rechtzeitig (nach 24 h Inkubation) abgeschnitten werden. Nach 48 h entfernt man die Halbkaryopsen und übergießt die Platten mit Jod-Lösung (etwa 1 min einwirken lassen). Anschließend ist die Jod-Lösung abzugießen.

##### **Auswertung:**

Die Platten werden fotografiert und das Ergebnis ist verbal einzuschätzen sowie zu interpretieren.

## **Komplex 5**

### **5.1. Nachweis der gewebespezifischen Genexpression durch GUS-Färbung**

Pflanzen sind stark kompartimentiert. Die bevorzugte Expression von Genen in bestimmten Pflanzenorganen bzw. Geweben (z.B. Mesophyll oder Bündelscheide im Blatt) kann nach Kopplung von Promotorsequenzen mit dem *gus* bzw. *uid* Gen nachgewiesen werden. Das GUS-Gen kodiert eine  $\beta$ -Glucuronidase, die in Pflanzen nicht vorkommt aber leicht durch Farbreaktion nachweisbar ist. Der Nachweis der GUS-Genaktivität erfolgt wie bei dem LacZ-System über ein chromogenes Analogon – dem X-Gluc, aus dem ein Anilinfarbstoff nach hydrolytischer Abspaltung von dem Glucuronrest durch die  $\beta$ -Glucuronidase freigesetzt wird. Die Enzymaktivität verursacht damit eine Blaufärbung spezifisch in dem Gewebe, wo die Expression des Reportergens stattgefunden hat.

**Untersuchungsobjekt:** Blätter transgener Arabidopsis-Pflanzen, in denen das *gus*-Gen mit einem Promotor für das H-Protein des GDC-Komplex gekoppelt vorliegt.

**Geräte und Lösungen:** Lichtmikroskop bzw. Binokular

X-Gluc-Puffer (200 ml; enthalten je 100 ml 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 8,84 und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 4,18; Lösungen mischen bis pH 7,0; 1 M Stammlösung]; 0,745 g EDTA, pH 8 [Endkonz. 10 mM, 372, 24 g/mol]; 0,329 g 5 mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ III [Endkonz. 5 mM, MG 329,26 g/mol]; 0,422 g  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ II [Endkonz. 5 mM, MG 422,41 g/mol]; 0,2 ml Triton X-100 [0,1 % v/v] und 1 mM X-Gluc [kurz vor Gebrauch zugeben]; auf 200 ml Gesamtvolumen mit A. dest. auffüllen)

**Durchführung:**

- Vom Wildtyp und transgenen Arabidopsis-Pflanzen je 2 Blätter abschneiden
- jedes Blatt einzeln in einem Eppendorfgefäß mit X-Gluc-Puffer versetzen
- Vakuuminfiltration der Blätter im Exsikkator mit angeschlossener Wasserstrahl- oder Membranpumpe, damit der Puffer gleichmäßig in das Blatt gesogen wird
- Vakuuminfiltration zweimal wiederholen, d.h. durch langsames Belüften Vakuum ablassen und erneut anlegen, die Blätter müssen transparent erscheinen
- Inkubation der infiltrierten Blätter bei 37°C über Nacht
- Entfärben der Blätter mit 70% Ethanol bei 70°C im Heizblock, so lange wiederholen, bis die Blätter vollständig entfärbt sind (keine Grünfärbung mehr)
- entfärbte Blätter werden mikroskopisch analysiert und möglichst photographisch dokumentiert

## 5.2. Bestimmung des mittleren Wasserpotentials des Kartoffelparenchym

Die Fähigkeit eines Pflanzengewebes, sich immer hinreichend mit Wasser zu versorgen, beruht auf dem vorhandenen osmotischen Potential des Zellsaftes. Die Größe des osmotischen Druckes der Zelle ist abhängig von der Gesamtkonzentration des Zellsaftes. Diese nimmt mit der Konzentration gelöster Teilchen zu. Ist das Außenmedium höher konzentriert als der Zellsaft, so wird der Zelle Wasser entzogen, ist der Zellsaft höher konzentriert als das Außenmedium nimmt die Zelle Wasser auf.

**Untersuchungsobjekt:** Gewebestücke von Kartoffelknollen (*Solanum tuberosum*)

**Geräte, Lösungen u.a.:** Reagenzgläser, Reagenzglasständer  
Saccharose-Lösungen: 0,2; 0,3; 0,6 bzw. 0,9 M  
Kartoffeln, Korkbohrer, Lineal, Schiebelehre

### Durchführung:

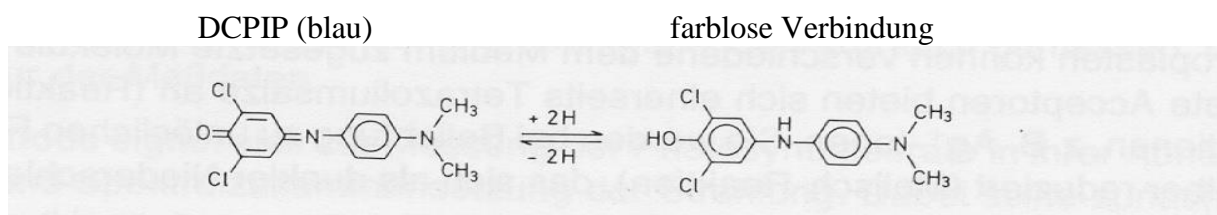
Zur Messung des Wasserpotentials der Kartoffelparenchymzellen ( $\Psi_w = \Psi_\pi + \Psi_p$ , bei undifferenzierten, gleichartigen, dehnbaren Zellen) bohrt man mit Hilfe eines Korkbohrers fünf (1 Kontrolle in A. dest. und vier Saccharosekonzentrationen) 6 bis 7 cm lange Stücke aus Kartoffeln heraus. Die Ausgangslänge ist mit einer Schiebelehre exakt zu bestimmen. Diese Zylinder überführt man in die mit Saccharoselösungen unterschiedlicher Konzentration gefüllten Reagenzgläser (je 15 ml einfüllen). Nach 2 h Inkubation wird die Länge erneut ausgemessen. In isotonischen Lösungen verändert sich die Länge des Zylinders nicht, in hypertonischen Lösungen verkürzen sich die Zylinder, in hypotonischen Medien werden die Zylinder länger.

### Berechnung und Auswertung:

Die isotonische Lösung liegt zwischen 0,2 und 0,4 M Saccharose. Durch Eintragen der Werte in ein Koordinatensystem lässt sich das osmotische Potential des Pflanzenpresssaftes abschätzen. Diesem Wert entspricht folglich auch die durchschnittliche molare Konzentration der Kartoffelparenchymzellen. Zum Vergleich ist aus dem Kartoffelparenchym mit Hilfe der Pflanzenpresse ein Presssaft zu gewinnen, der am Gefrierpunktsmometer ausgemessen wird (siehe Versuch 3.3).

## 5.3. Isolation von Chloroplastenfragmenten aus Pflanzenblättern zum Nachweis der Hill-Reaktion

Um Teilprozesse der Photosynthese näher zu analysieren, ist es notwendig, die Chloroplasten aus grünen Blättern zu isolieren. 1937 entdeckte Robert Hill, dass isolierte Chloroplasten/Thylakoid-Präparationen im Licht zahlreiche Verbindungen reduzieren können.



Als klassisches „Hill-Reagenz“ wird z.B. eine gelbe Kaliumferricyanid-Lösung verwendet, wobei das dreiwertige Eisen als Elektronenakzeptor (Entstehung von  $\text{Fe}^{2+}$ ) anstelle von  $\text{NADP}^+$  wirkt. In Gegenwart dieses Akzeptors kann man eine lichtinduzierte Sauerstoffentwicklung in der isolierten Chloroplasten/Thylakoidsuspension messen. Alternativ können bei der Hill-Reaktion auch andere künstliche Elektronenakzeptoren an verschiedenen Stellen des Elektronentransportsystems Elektronen abfangen. Ein solches Reagenz ist z.B. DCPIP (Dichlorphenol-indophenol), das vor allem Elektronen hinter dem Photosystem 1 aufnimmt. DCPIP ist ein blauer Farbstoff, der zu einer farblosen Verbindung reduziert wird. Ferricyanid kann in Chloroplasten diffundieren, während DCPIP nicht membrangängig ist.

### **Chloroplastenisolation**

**Untersuchungsobjekt:** Blätter von Erbse (*Pisum sativum*)

#### **Chemikalien/Geräte**

Homogenisationspuffer: 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - Phosphat-Mischpuffer, pH 7,8; mit Saccharosezusatz (Saccharoseendkonzentration 0,4 mol/l) bzw. ohne Saccharose, Mörser, Quarzsand, Mull, kühlbare Zentrifuge Sigma K30

#### **Durchführung:**

- Mörser und Pistill müssen im Eisbehälter vorgekühlt werden
- ca. 4 g frisches Blattmaterial im Mörser zerkleinern, feste Bestandteile entfernen
- mit 2 ml Saccharose-haltigem Homogenisationspuffer und 2 Löffeln Quarzsand auf Eis zerreiben, zügig arbeiten
- über einem eisgekühlten Zentrifugenbecher (50 ml) im Becherglas wird der Pflanzenbrei über 4 Lagen Mull abfiltriert
- Mörser zweimal mit je 4 ml Puffer spülen
- bei 200 g (ca. 1000 U/min) für 5 min in Sigmazentr. bei 4°C abzentrifugieren
- Überstand abnehmen, und in 2 frische 50 ml Zentrifugenbecher aufteilen, bei 1000 g in Sigmazentrifuge bei 4°C für 10 min zentrifugieren
- Überstände abnehmen und verwerfen
- erstes Pellet mit 5 ml kaltem Saccharose-haltigem Puffer resuspendieren, für Sauerstoffelektrode 5.3.1. und 1.1
- zweites Pellet mit 5 ml kaltem Saccharose-freiem Puffer resuspendieren, (→ Chloroplasten werden durch diesen hypoosmotischen Schock osmotisch aufgebrochen) für kolorimetrischen Test mit DCPIP 2.4.2. 5.

### **5.3.1 Nachweis der Hill-Reaktion mit Hilfe der Sauerstoffelektrode**

#### **Material/Chemikalien**

Chloroplasten/Thylakoidsuspension (in Saccharose-haltigem Puffer), 1 M Kaliumhexocyanoferrat-Lösung ( $\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6$ ); Sauerstoffmessgerät, Schreiber, Lichtquelle, temperierte Küvette, Mikropipetten,

#### **Durchführung**

Die in Saccharose-haltigem Puffer aufgenommene Chloroplasten/Thylakoidsuspension wird in die auf 20°C temperierte Messkammer der Sauerstoffelektrode blasenfrei

eingefüllt. Zunächst wird die Suspension im Dunkeln inkubiert, bis sich ein konstanter Sauerstoffgehalt nach Temperaturabgleich einstellt (ca. 7 min). Dann wird die Sauerstoffkonzentrationsveränderung für 2 min im Licht gemessen. Danach werden der Suspension etwa 1/10 Volumen der Ferricyanid-Lösung zugesetzt und die Sauerstoffentwicklung für weitere 2 min im Licht verfolgt. Die Raten der Sauerstoffentwicklung sind zu berechnen (siehe Bedienungsanleitung Komplex 1) und vergleichend zu diskutieren.

### 5.3.2. Kolorimetrischer Nachweis des Elektronentransports

#### Material/Geräte

Chloroplasten/Thylakoidsuspension (in Saccharose-freiem Puffer), Verdünnungspuffer: 10 mM NaCl in 50 mM Phospat-Mischpuffer (s.o.), pH 7,0; DCPIP 1 mM, Spektralphotometer, Lichtquelle, Küvetten, Verkleidung für Küvetten

#### Durchführung

- Chloroplastensuspension mit Verdünnungspuffer 1+2 verdünnen (0,5 ml + 1 ml)
- 4 Ansätze direkt in Küvetten ansetzen:

|                                      | Ansatz 1<br><b>BW</b> | Ansatz 2<br><b>Messansatz</b> | Ansatz 3<br><b>Dunkel-<br/>Kontrolle</b><br>(Küvette<br>verkleiden) | Ansatz 4<br><b>Licht-<br/>Kontrolle</b><br>(ohne<br>Chloroplasten) |
|--------------------------------------|-----------------------|-------------------------------|---|--|
| Verdünnungspuffer                    | 2,7 ml                | 2,5 ml                        | 2,5 ml  | 2,6 ml   |
| DCPIP Stammlösung                    | -                     | 100 µl                        | 100 µl  | 100 µl   |
| Verdünnte<br>Chloroplastensuspension | -                     | 100 µl                        | 100 µl  | -  |

- nach Umschütteln wird bei **578 nm** die Extinktion  $E_0$  der Ansätze 2, 3, 4 gegen den BW (Ansatz 1) gemessen
- Ansatz 3 dunkel stellen, Ansatz 4 vor die Lichtquelle und dort bis zum Ende des Versuches (letzte Messung Ansatz 2) stehen lassen (s. unten)
- Ansatz 2 (Messansatz) für 1 min aus Photometer entnehmen und vor Lichtquelle halten, danach zurück ins Photometer stellen →  $E_1$  messen → Küvette wieder im Licht inkubieren
- In 1minütigen Abständen diese Messungen 15 x wieder holen →  $E_1$ - $E_{15}$
- $E_{15}$  auch von den Ansätzen 3 und 4 aufnehmen, hier sollte keine Extinktionsveränderung zu beobachten sein

**Auswertung:** Die Ergebnisse der Extinktionsmessungen von Ansatz 2 (Messansatz) sind graphisch (x-y-Diagramm) darzustellen und zu diskutieren.

## 6. Anhang- Richtlinien zur Protokollierung

Versuchsprotokolle sind Dokumente, die den Ablauf eines Experimentes korrekt und in allen wesentlichen Punkten vollständig beschreiben sollen. Auf jeden Fall sollte folgenden grundsätzlichen Anforderungen Rechnung getragen werden:

**Vollständigkeit:** Das Protokoll muss alle biologischen Materialien und methodischen Randbedingungen wiedergeben, die ein sachkundiger Bearbeiter benötigt um das Experiment unabhängig zu reproduzieren. Die Daten (auf jeden Fall die **Rohdaten**, abgelesene oder ausgedruckte Messwerte usw. aber auch korrigierte, gemittelte, normierte oder anders verrechnete Werte) müssen vollständig in übersichtlicher Form (in der Regel in Tabellen) enthalten sein. Alle mathematischen Operationen müssen so ausführlich dargestellt sein, dass sie jederzeit nachvollziehbar sind.

**Übersichtlichkeit:** Die Beschreibung von Resultaten muss klar und deutlich gegliedert sein, so dass sich der Leser (nicht nur der Verfasser!) auf einen Blick im Protokoll zurechtfindet. **Besonders wichtig ist die Gestaltung von Tabellen und graphischen Darstellungen, die grundsätzlich mit Legenden zu versehen sind.** Diese sollten so gestaltet sein, dass ohne Hilfe des Textes die dargestellten Daten verstanden werden können. Zur Erhöhung der Anschaulichkeit sollten quantitative Daten möglichst in einer graphischen Form dargestellt werden. Es ist bei der Darstellung von Funktionen  $y = f(x)$  allgemein üblich, die Abszisse für die experimentelle (unabhängige) Variable (x) und die Ordinate für die gemessene (abhängige) Variable (y) zu verwenden.

**Theoretische Auswertung:** Jedem wissenschaftlichen Experiment liegt eine Fragestellung zugrunde, die im Ergebnis beantwortet sein sollte. Für die Planung von weiteren Experimenten ist es von entscheidender Bedeutung, dass experimentelle Daten kritisch gesichtet und ausgewertet werden. Auch hier sollte man sich nicht auf das Gedächtnis verlassen, sondern alle methodischen und inhaltlichen Schlussfolgerungen, notwendige Konsequenzen, aufgetretene Widersprüche usw. im Protokoll festhalten.

Ein allgemeines Schema zur **Protokollführung für die in Rahmen von Praktika** durchgeführten Experimente ist im Folgenden skizziert. Es orientiert sich an der allgemein praktizierten Form, in der experimentelle Originalarbeiten publiziert werden.

1. **Thema:** Möglichst treffsichere, informative, kurz und prägnant formulierte Überschrift
2. **Einleitung/Erwartungen/Hypothese:** Kurze Darstellung des derzeitigen Kenntnisstandes und daraus entwickelt die konkrete Problemstellung welche bearbeitet werden soll. Die theoretisch zu erwartenden Ergebnisse sind zu formulieren - Hypothese.
3. **Material:** Exakte Charakterisierung des verwendeten Untersuchungsmaterials
4. **Methoden:** Nur eine Beschreibung von Abweichungen der Methoden im Skript
5. **Resultate:** Messwerte im Original und in rechnerisch aufbereiteter Form, zusammengefasst in Tabellen, Diagrammen, schematischen Zeichnungen usw.
6. **Diskussion:** Kritische Bewertung der Ergebnisse vor dem Hintergrund der in der Einleitung formulierten Fragestellung/Hypothese, Schlussfolgerungen hinsichtlich der zu prüfenden Hypothese, Fehlerbetrachtung, Kritik, Verbesserungsvorschläge für weitere Experimente.

**Zeit: ganztägig 1 Woche lang**

Beginn: 9.00 Uhr

Ende: ca. 16.00 Uhr

(1 h Mittagspause je nach Versuchsfortschritt)

**Ort:**

Praktikumsraum 3. OG, Einsteinstr. 3a

**Teilnehmer: Studenten Biologie/Bachelor B10b und Lehramt  
Gymnasium**

Voraussetzung für die Teilnahme am Praktikum ist die besuchte Vorlesung Pflanzenphysiologie.

Die Studenten wurden zu 15 Gruppen mit jeweils 4-5 Studenten eingeteilt.

Die Gruppenzusammensetzung kann nach Absprache mit dem Praktikumsbetreuer getauscht werden (siehe separate Datei mit der vorläufigen Gruppenzusammensetzung).

**Von jedem Studenten sind folgende Sachen mitzubringen:**

Ausgedruckte Praktikumsvorschrift (Datei auf der Homepage Pflanzenphysiologie unter „Scripte“)

Kittel mit Namensschild

Wasserfester Stift

Schreibzeug

Lineal

Taschenrechner

Datenstick

Pinzette

Schere

Digitalkamera (1 pro Gruppe)

Rostock, 2.1.2018

Prof. Dr. Martin Hagemann