



Schriftenreihe

Nicolas Brüggemann

Untersuchungen zur Regulation der Isoprenbildung bei Eichen

Herausgeber: Prof. Dr. Wolfgang Seiler
Fraunhofer-Institut Atmosphärische Umweltforschung
Kreuzeckbahnstr. 19, 82467 Garmisch-Partenkirchen
Garmisch-Partenkirchen, 2002

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Brüggemann, Nicolas:

Untersuchungen zur Regulation der Isoprenbildung bei Eichen/

Nicolas Brüggemann. Aachen : Shaker, 2002

(Schriftenreihe des Fraunhofer-Instituts Atmosphärische Umweltforschung;
Bd. 2002,70)

Zugl.: Freiburg, Univ., Diss., 2001

ISBN 3-8265-9848-2

Copyright Shaker Verlag 2002

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-9848-2

ISSN 1436-1094

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

1	Einleitung	1
1.1	Biogene flüchtige organische Verbindungen (BVOC)	1
1.2	Bedeutung der BVOC für die Chemie der Atmosphäre	2
1.3	Quellen und Senken für BVOC	4
1.4	Wichtigste Komponente der BVOC: Isopren und seine Bedeutung.....	6
1.5	Biosynthese des Isoprens	8
1.6	Regulation der Isoprenemission	13
1.6.1	Substratabhängigkeit der Isoprenemission	15
1.6.2	ATP-Abhängigkeit der Isoprenemission	16
1.6.3	Temperaturabhängigkeit der Isoprenemission	17
1.6.4	Abhängigkeit der Isoprenemission vom Isoprensynthesegehalt	18
1.6.5	Weitere Umweltfaktoren	19
1.7	Möglichkeiten der Vorhersage der Isoprenemission	20
1.8	Ziele der Arbeit	21
2	Material und Methoden	24
2.1	Pflanzenmaterial und Anbaumethoden	24
2.1.1	Stieleiche (<i>Quercus robur</i> L.).....	24
2.1.1.1	Klonmaterial	24
2.1.1.2	Generatives Material	26
2.1.2	Flaumeiche (<i>Quercus pubescens</i> Willd.).....	27
2.1.2.1	Generatives Material für die Bodentrockenheits- Experimente.....	27
2.1.2.2	Baum am Naturstandort (bei Montpellier, Frankreich).....	27
2.1.3	Pilzkultur (<i>Laccaria laccata</i>).....	28
2.2	Synthese von Isopentenylidiphosphat (IDP) und Dimethylallyldiphosphat (DMADP)	29
2.3	Standardmethode zur Herstellung von Blattextrakten	31
2.4	Spektralphotometrische Analysen	32
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	32
2.4.2	Bestimmung der Chlorophyll- und Carotinoidgehalte	33
2.5	Gaschromatographische Analytik des Isopren.....	34
2.5.1	Identifizierung und Quantifizierung des Isoprens	35
2.6	Bestimmung von DMADP in Blättern	37
2.6.1	Extraktion und Nachweis des DMADP	37

2.6.2	Berechnung der DMADP-Konzentrationen in Blättern.....	38
2.7	Standardtest zur Bestimmung der IDP-Isomerase-Aktivität	40
2.7.1	Berechnung der IDP-Isomerase-Aktivität	40
2.8	Standardtest zur Bestimmung der Isoprensynthase-Aktivität	41
2.8.1	Berechnung der Isoprensynthase-Aktivität	42
2.9	Messungen des photosynthetischen Gaswechsels und der Isoprenemission.....	43
2.9.1	Aufbau der Messanlage.....	44
2.9.2	Aufbau der Blattküvetten.....	46
2.9.3	Beleuchtungsaufsatz.....	49
2.9.4	Bestimmung des photosynthetischen Gaswechsels mittels eines Infrarotabsorptionsdifferenz-Analysators (Differenz-BINOS).....	50
2.9.4.1	Messprinzip.....	50
2.9.4.2	Kalibration.....	50
2.9.4.3	Durchführung der Messungen.....	51
2.9.4.4	Berechnung der Gaswechselgrößen.....	52
2.9.5	Bestimmung der Isoprenemission mittels eines schnellen Isoprenanalysators (FIS).....	54
2.9.5.1	Messprinzip des FIS.....	54
2.9.5.2	Kalibration.....	56
2.9.5.3	Durchführung der Messungen.....	57
2.9.5.4	Berechnung der Emissionsraten.....	57
2.9.6	Kalibration der übrigen Komponenten der Gaswechsellmessanlage...	59
2.9.6.1	Absolut-BINOS.....	59
2.9.6.2	Taupunktspiegel.....	60
2.9.6.3	Gasflussregler.....	60
2.9.6.4	Thermoelemente.....	60
2.9.6.5	Quanten-Sensoren.....	60
2.9.7	Datenerfassung.....	61
2.9.8	Durchführung der Messungen.....	62
2.10	Solardomexperimente.....	64
2.10.1	Aufbau der Kammern.....	66
2.10.2	Versuchsbegleitende Erfassung von Strahlungs- und Klimadaten.....	68

2.10.3	Bestimmung des Wasserpotenzials vor der Dämmerung (<i>pre-dawn water potential</i>).....	69
2.10.4	Versuchsdurchführung.....	70
2.10.4.1	Messung von Tagesverläufen des Gaswechsels und der Isoprenemission bei der Stieleiche	70
2.10.4.2	Messung des Gaswechsels und der Isoprenemission in Abhängigkeit von Bodentrockenheit bei der Flaumeiche.....	71
2.10.4.3	Messung des Gaswechsels und der Isoprenemission in Abhängigkeit von Bodentrockenheit bei der Stieleiche.....	72
2.11	Einfluss von Mehлтаubefall auf die Isoprenbiosynthese bei der Stieleiche...	73
2.11.1	Versuchsdurchführung.....	73
2.11.2	Versuchsbegleitende Erfassung von Strahlungs- und Klimadaten.....	74
2.12	Freilandexperiment mit der Flaumeiche am Naturstandort	74
2.13	Datenverarbeitung und Statistik.....	76
2.14	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	77
3	Ergebnisse	78
3.1	Entwicklung eines nicht-radioaktiven Enzymtests zur Bestimmung von <i>in vitro</i> -Aktivitäten der IDP-Isomerase.....	78
3.1.1	pH-Abhängigkeit der DMADP-Hydrolyse.....	78
3.1.2	Konzentrationsabhängigkeit der DMADP-Hydrolyse.....	79
3.1.3	Temperaturabhängigkeit der DMADP-Hydrolyse.....	82
3.1.4	Zeitabhängigkeit der DMADP-Hydrolyse.....	83
3.2	Charakterisierung der IDP-Isomerase in Blättern der Stieleiche	83
3.2.1	pH-Abhängigkeit.....	84
3.2.2	Substratabhängigkeit.....	85
3.2.3	Temperaturabhängigkeit (E_A nach Arrhenius).....	88
3.2.4	Zeit- und Proteinabhängigkeit.....	90
3.2.5	Reproduzierbarkeit des IDP-Isomerase-Tests	90
3.3	Nachweis von DMADP in Blattextrakten über <i>head space</i> -Analyse.....	91
3.4	Regulation der Isoprenbildung bei der Stieleiche	94
3.4.1	Enzymaktivitäten der IDP-Isomerase und der Isoprensynthese im Tagesverlauf	95
3.4.2	DMADP-Blattkonzentrationen im Tagesverlauf.....	97

3.4.3	Tagesgänge des photosynthetischen Gaswechsels und der Isoprenemission.....	99
3.4.4	Korrelation der DMADP-Blattgehalte mit der Netto-Assimilation und mit der Isoprenemission	108
3.4.5	Korrelation der Enzymaktivitäten der IDP-Isomerase und der Isoprensynthese mit der Isoprenemission	110
3.5	Einfluss von Umweltfaktoren auf die Isoprenbildung und -emission	111
3.5.1	Effekt von Mehltreibbefall auf die Isoprenbildung bei der Stieleiche....	111
3.5.1.1	Chlorophyllgehalte und photosynthetischer Gaswechsel	112
3.5.1.2	IDP-Isomerase- und Isoprensynthese-Aktivitäten sowie Isoprenemission	113
3.5.1.3	Korrelation der Isoprenemission mit dem Chlorophyllgehalt.....	114
3.5.2	Einfluss von Bodentrockenheit auf die Isoprenbildung bei der Stieleiche und der Flaumeiche.....	115
3.5.2.1	Stieleiche.....	116
3.5.2.1.1	Photosynthetischer Gaswechsel.....	116
3.5.2.1.2	IDP-Isomerase- und Isoprensynthese-Aktivitäten sowie Isoprenemission.....	118
3.5.2.2	Flaumeiche	119
3.5.2.2.1	Photosynthetischer Gaswechsel	119
3.5.2.2.2	IDP-Isomerase- und Isoprensynthese-Aktivitäten sowie Isoprenemission.....	121
3.5.3	Verteilung der IDP-Isomerase- und Isoprensynthese-Aktivitäten im Kronenraum einer Flaumeiche im Freiland	124
4	Diskussion	129
4.1	Neue Methode zur Bestimmung von DMADP-Gehalten in Blättern.....	130
4.2	Neue Methode zur Bestimmung von IDP-Isomerase-Aktivitäten in Blättern.....	132
4.3	Charakteristika der IDP-Isomerase in Blättern der Stieleiche.....	133
4.4	Bedeutung der IDP-Isomerase für die Isoprenoidbiosynthese.....	137
4.5	Regulation der Isoprenbildung bei der Stieleiche im Tagesverlauf.....	139
4.6	Einfluss von Umweltfaktoren auf die Isoprenbiosynthese	146
4.6.1	Mehltreibbefall bei der Stieleiche.....	146
4.6.2	Bodentrockenheit bei der Stieleiche und bei der Flaumeiche	148

4.6.3	Position der Blätter innerhalb der Baumkrone bei der Flaumeiche ..	151
4.7	Ausblick	153
5	Zusammenfassung	155
6	Literatur	158
7	Anhang	173
7.1	Klimadaten	173
7.1.1	Standort Wank	173
7.1.1.1	Solardomexperiment 1998	173
7.1.1.2	Solardomexperiment und Bodentrockenheitsexperiment 1999 ..	175
7.1.1.3	Bodentrockenheitsexperiment 2000	176
7.1.2	Standort IFU: Mehltauversuche 1998 und 1999	178
7.2	Charakteristik der Küvetten zur Bestimmung des photosynthetischen Gaswechsels und der Isoprenemission	180
7.3	Charakteristik der Messanlage zur Bestimmung des photosynthetischen Gaswechsels und der Isoprenemission	181
7.4	Kalibration der Messanlage zur Bestimmung des photosynthetischen Gaswechsels	183
7.4.1	BINOS-Kalibration	183
7.4.2	Kalibration der Thermoelemente	187
7.4.3	Kalibration der Quanten-Sensoren	188
7.5	Bestimmung der Licht- und Temperaturabhängigkeit des photosynthetischen Gaswechsels und der Isoprenemission bei <i>Quercus robur</i> für die Korrektur der Messdaten	189
7.6	Auswertedateien (Syntax-Files) für die Berechnung des photo- synthetischen Gaswechsels und der Isoprenemission sowie der <i>in vitro</i> -Aktivitäten der IDP-Isomerase und der Isoprensynthese	191
7.6.1	Photosynthetischer Gaswechsel und Isoprenemission	191
7.6.2	IDP-Isomerase	198
7.6.3	Isoprensynthase	200
	Danksagung	202

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat	NMR	Kernmagnetresonanz
C	Kohlenstoff	PAR	Photosynthetisch aktive Strahlung ($\lambda = 400-700$ nm)
CHES	2-(N-Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure	pmol	Picomol (10^{-12} mol)
d	Tag	ppmv	parts per million by volume, Volumenanteil pro eine Million Volumeneinheiten
DMAA	Dimethylallylalkohol	pptv	parts per trillion by volume, Volumenanteil pro eine Milliarde Volumeneinheiten
DMADP	Dimethylallyldiphosphat	Q ₁₀ -Wert	Faktor, um den die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion bei Temperaturerhöhung um 10°C zunimmt
DMVC	Dimethylvinylcarbinol	R _f	Verhältnis der Laufstrecke einer chemischen Verbindung zur Laufmittelfront bei der chromatographischen Trennung
DTT	Dithiothreitol	rpm	Umdrehungen pro Minute
FG	Frischgewicht	scmpm	Fluss in Kubikzentimetern pro Minute unter Standardbedingungen
fmol	Femtomol (10^{-15} mol)	SD	Standardabweichung
g	Erdbeschleunigung	slpm	Fluss in Litern pro Minute unter Standardbedingungen
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	TG	Trockengewicht
IDP	Isopentenylidiphosphat	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
KAS	Kaltaufgabesystem	ü.N.N.	über Normalnull
kJ	Kilojoule	UV-A, -B, -C	Ultraviolettstrahlung: UV-A = 380 - 315 nm, UV-B = 315 - 280 nm, UV-C = 280 - 100 nm
K _m -Wert	Substratkonzentration, bei der die enzymatische Umsatzgeschwindigkeit halbmaximal ist	v/v	Volumenanteil
λ	Wellenlänge des Lichts		
μ E	Einheit der Photonenflussdichte = $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetisch aktive Photonen ($\lambda = 400-700$ nm)		
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure		
MEZ	Mitteuropäische Zeit		
mmol	Millimol (10^{-3} mol)		
μ mol	Mikromol (10^{-6} mol)		
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure		
MW	Mittelwert		
NADPH	Nicotinamid-dinucleotidphosphat		
nmol	Nanomol (10^{-9} mol)		
VI			