

Pflanzenphysiologisches Praktikum für Studierende Biologie-Bachelor und Lehramt Gymnasium WS 2019/20

25.1. – 29.1.2021: Bachelor Biologie (2er Gruppen)

1.2. – 5.2.2021: Lehramt Gymnasium (2er Gruppen)

Vormittag: 8.30-12.00 Uhr

Nachmittag: 13.00-16.30 Uhr

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 O₂-Messung **S. 2**
 - 1.2. Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität in Cyanobakterienzellen als Maß für die Respiration **S. 4**

- 2. Komplex (Photosynthesepigmente)**
 - 2.1. Absorptionsspektrum, *in vivo* Pigmentkonzentrationen von Cyanobakterienkulturen **S. 7**
 - 2.2. *in-vitro*-Chlorophyll-a-Gehalt: Vgl. Cyanobakterien mit Pflanzen **S. 9**
 - 2.3. Dünnschichtchromatographische Trennung von Pigmenten **S. 11**

- 3. Komplex (Ionengehalt/Osmotisches Potential bei Glyko- und Halophyten)**
 - 3.1. Chloridbestimmung in Presssäften durch maßanalytische Chloridbestimmung mit Silbernitrat **S. 12**
 - 3.2. Bestimmung der Na⁺- und K⁺-Konzentration in Presssäften mit Hilfe der Flammenphotometrie **S. 14**

- 4. Komplex (Molekulare Pflanzenphysiologie, Hormone)**
 - 4.1. Nachweis von Isoenzymen der Superoxiddismutase **S. 15**
 - 4.2. Induktion von amylolytischer Aktivität im Endosperm der Gerstenkaryopse durch Gibberellin **S. 18**

- 5. Komplex (Photosynthese, Histologie)**
 - 5.1. Nachweis der gewebespezifischen Genexpression durch GUS-Färbung **S. 19**
 - 5.2. Bestimmung des mittleren Wasserpotentials des Kartoffelparenchyms **S. 20**
 - 5.3. Isolation von Chloroplastenfragmenten aus Pflanzenblättern zum Nachweis der Hill-Reaktion **S. 20**
 - 5.3.1. Nachweis mit Hilfe der Sauerstoffelektrode
 - 5.3.2. Kolorimetrischer Nachweis des Elektronentransportes

- 6. Anhang – Hinweise zur Protokollierung **S. 23****
Notwendige Ausrüstung der Studenten/innen **S. 24**

1.1. Bestimmung der Respirationsrate sowie Aufnahme der Photosynthese-Licht-Kurve einer Cyanobakterienkultur durch elektrochemische O₂-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.

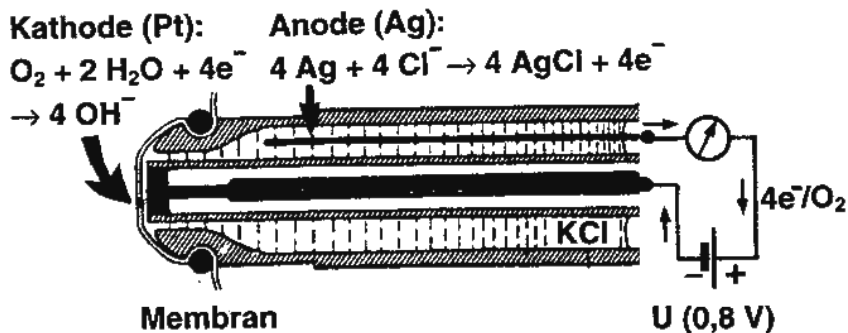
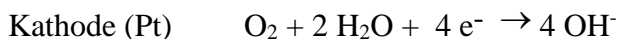
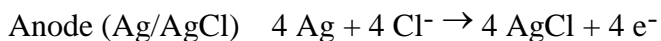


Abbildung 1: Aufbau und Messprinzip der Sauerstoffelektrode nach Clark.

Eine Platin-Kathode (Pt) wird einer Polarisationsspannung 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 O₂-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 O₂-Konzentration im Wasser ist (4e⁻ pro 1 O₂); durch Messung dieses Elektrodenflusses (als Spannung) kann die gelöste O₂-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).

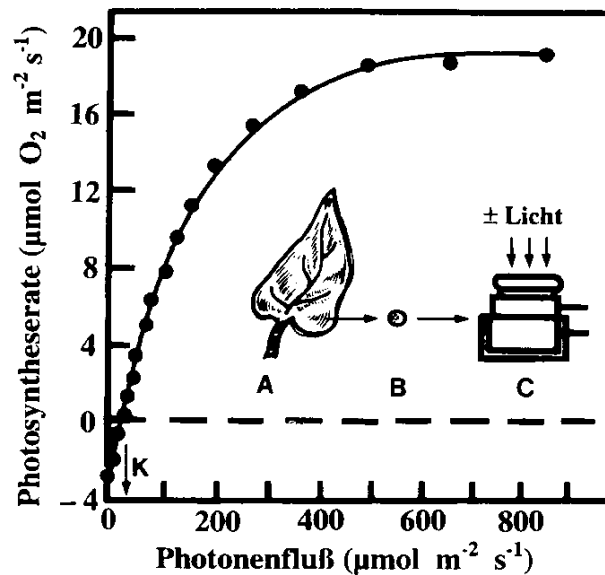


Abbildung 2: Abhängigkeit der Photosyntheserate eines Sonnenblattes von Spinat von der Lichtintensität (Photonenflussdichte) - PS/Licht-Kurve, K- Lichtkompensationspunkt; (nach Walker, 1995).

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 O₂-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 O₂-Sättigung zu hoch ist, so dass Schreiberbereich nicht ausreicht, kann die Probe für ca. 3 min mit Stickstoff begast werden, um den O₂-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 O₂ (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 E₇₅₀:

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

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 O₂-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⁺ bzw. NADP⁺. 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⁺ bzw. NADP⁺ 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).

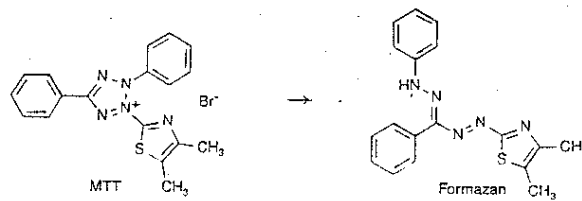


Fig. 1: By the action of mitochondrial dehydrogenases MTT is metabolized to form a formazan salt.

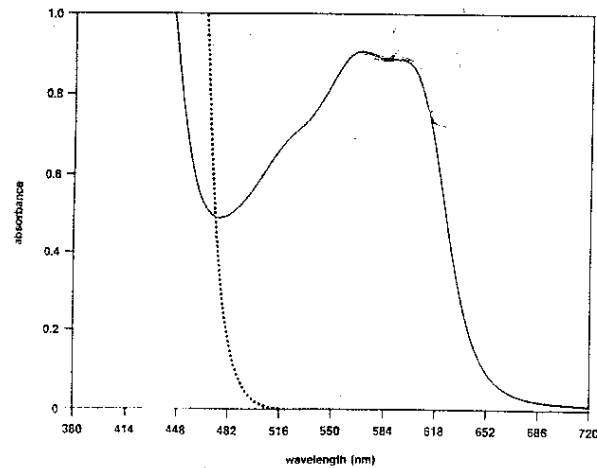


Abbildung 3: Darstellung der MTT-Reduktion sowie des daraus resultierenden Absorptionsverhaltens (gepunktete Linie - MTT, durchgezogene Linie – Formazan)

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 Probennahme 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 Eppendorfszentrifuge 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.

Komplex 2 - Photosynthesepigmente

2.1. Absorptionsspektren, Charakterisierung der *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 ϵ kann nach Extinktionsmessung in einer Küvette bekannter Schichtdicke die Konzentration einer gelösten absorbierenden Substanz berechnet werden (Lambert-Beersches Gesetz).

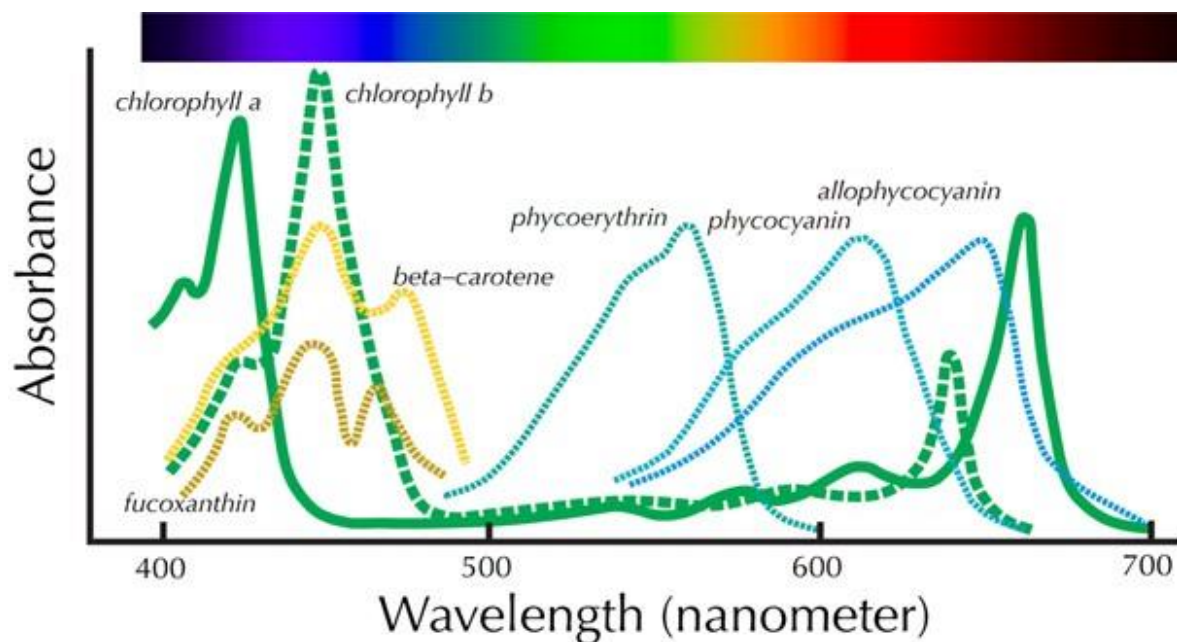


Abbildung 4: Absorptionsspektren der photosynthetischen Pigmente nach Isolation in organischen bzw. wässrigen Lösungsmitteln.

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.

- bei folgenden Wellenlängen sind die Extinktionen zu ermitteln: **750, 680, 625** und **490** nm. Es wird gegen A. dest. gemessen und die Messwerte werden manuell notiert.

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 E₇₅₀-Wertes (Trübungswert) zu korrigieren (z.B. E₆₈₀-E₇₅₀). Da die Pigmente bei E₇₅₀ selbst nicht absorbieren, entspricht dieser Wert der unspezifischen Lichtabsorption in der Küvette.

2. Korrektur: Diese Werte anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

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

für Carotenoide (490 nm)

$$E_{490 \text{ kor}3} = 1,152 \times E_{490 \text{ kor}2} - (0,0244 \times E_{680 \text{ kor}2} + 0,0415 \times E_{625 \text{ kor}2})$$

für Phycocyanin (625 nm)

$$E_{625 \text{ kor}3} = 1,0114 \times E_{625 \text{ kor}2} - 0,2488 \times E_{680 \text{ kor}2}$$

für Chlorophyll a (680 nm)

$$E_{680 \text{ kor}3} = 1,0114 \times E_{680 \text{ kor}2} - 0,0465 \times E_{625 \text{ kor}2}$$

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

$$c \text{ (mol/l)} = \frac{E_{\text{kor}3}}{\epsilon \times d}$$

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

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

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

- 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), CaCO_3 , gereinigter Quarzsand, Mörser, Pistille, Glasfaserfilter, Zentrifuge Sigma K30, Zentrifugenröhrchen (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 wird dann 1 ml der Cyanobakteriensuspension pipettiert
- 5 min Zentrifugation der Eppendorfgefäße bei 13.000 Upm
- **vollständiges** Absaugen des Überstandes mit der Pipette
- Auswägen der Gefäße mit den Algenpellets
- Differenzbildung dieser Masse mit der "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

ϵ von Chl a in Methanol bei 663 nm = 79,2 L x g⁻¹ x cm⁻¹ (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⁻¹ bzw. µg x ml⁻¹ Extrakt
- Umrechnung des Chl a in µg x ml⁻¹ Algensuspension unter Berücksichtigung des eingesetzten Algenvolumens und des Methanolvolumens (Verdünnungsfaktor)
- Berechnung des Chl a-Gehalts pro Biomasse mit Hilfe der oben ermittelte Frischmasse (FM) in µg Chl a x mg⁻¹ FM

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

- ca. 250 mg Blattmasse abwiegen (genaue Masse notieren!)
- Blattmaterial kleinschneiden und in den Mörser geben
- im Mörser unter Zusatz von Quarzsand, einer Spatelspitze CaCO₃ und 1 ml Aceton (90 %ig) fein zerreiben (Aceton evtl. nachfüllen, wenn es trocken wird)
- 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 ϵ 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⁻¹ FM umzurechnen (Verdünnung bzw. Mengenverhältnisse mit Einheiten beachten!).

2.3. Dünnschichtchromatographische Trennung von Pigmenten -Vergleich Cyanobakterien-höhere Pflanzen – **Demonstration der Ergebnisse**

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.

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

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

Folgende Vergleiche sind im Protokoll zu Komplex 2 anzustellen und zu diskutieren:

- Vergleich des *in vivo* bestimmten Chl a-Gehaltes der Cyanobakterien ($\mu\text{mol/ml}$) mit dem *in vitro* ermittelten Wert ($\mu\text{g/ml}$): 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 $\mu\text{g Chl a/mg FM}$
- Vergleich des *in vitro* bestimmten Chl a-Gehaltes mit dem Chl b-Gehalt bei Calla ($\mu\text{g Chl a bzw. Chl b/mg FM}$)

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*)
Halophyt: Salzmiere (*Honckenya peploides*)

Herstellung der Presssäfte - Materialien, Geräte

Pflanzenpresse, zwei 15 ml Zentrifugenröhrchen

Blätter von Glykophyten und Halophyten werden mit Hilfe einer Pflanzenpresse ausgepresst. Der Presssaft (ca. 4 ml) 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 so gewonnene Presssaft dient zur Bestimmung von:

1. Cl⁻-Gehalt (Titration, 3.1.)
2. K⁺- und Na⁺-Konzentration (Flammenphotometer, 3.2.)
3. osmotische Konzentration (Gefrierpunktsmometer, 3.3.)

Für die Titration kann der Überstand des Presssaftes direkt aus den Zentrifugenröhrchen zu den Titrationsansätzen pipettiert werden.

Für das Flammenphotometer und das 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 Tischzentrifuge (5 min, 13.000 U/min) zentrifugiert. Die klaren Überstände werden anschließend sofort in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße (2x Halophyt, 2x Glykophyt) überführt und für die jeweiligen Messungen eingesetzt.

3.1. Chloridbestimmung in Presssäften durch Titration mit Silbernitrat

Der Chloridgehalt in Presssäften wird mit einer Silbernitratlösung (AgNO₃, bitte Handschuhe anziehen) unter Verwendung von Kaliumchromat (K₂CrO₄) als Indikator titriert. Dabei fällt zunächst AgCl aus, so dass die Lösung trüb wird. Ist kein Chlorid mehr in der Lösung, bildet überschüssiges Ag⁺ mit dem Chromat einen schwerlöslichen, rotbraunen Ag₂CrO₄-Komplex aus, welcher den Umschlagpunkt der Titration kennzeichnet.

Material:

0,01 M AgNO₃, 0,01 M NaCl, 5% K₂CrO₄-Lösung, Presssaft von Glyko- und Halophyten, Bürette, 4 Erlenmeyerkolben

Durchführung:

Folgende Ansätze sind vorzubereiten:

a) Titerbestimmung (F)	10 ml NaCl (0,01 M) 90 ml A. dest	} + je 1 ml K ₂ CrO ₄ -Lösung
b) Blindwert	100 ml A. dest	
c) Glykophyt	1 ml Presssaft Raps 99 ml A. dest	
d) Halophyt	0,5 ml Presssaft Salzmier 99,5 ml A. dest	

Beginnend mit der Titerbestimmung (Ansatz a) 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:

- Das für den Blindwert (b) verbrauchte Volumen an AgNO₃ ist vor der Berechnung von den Volumina der Ansätze a, c und d zu subtrahieren.
- Anhand der Titerbestimmung (Ansatz a) wird der Eichfaktor F berechnet:

$$F = \frac{10 \text{ ml NaCl}}{x \text{ ml AgNO}_3}$$

- Die Konzentration von Chlorid in den Presssäften ist danach mit folgender Formel zu berechnen:

$$Cl^- [M] = \frac{V_T * F * C_e}{V_P}$$

- V_T [ml] - Volumen der zur Titration verbrauchten AgNO₃-Lösung nach Abzug des Blindwerts
- F - Eichfaktor
- C_e [M] - Konzentration der AgNO₃-Lösung
- V [ml] - Volumen des eingesetzten unverdünntes Presssaftes

- Nach Umrechnung der Konzentrationen in mM werden die Cl⁻-Gehalte in Glyko- und Halophytensaft vergleichend diskutiert.

3.2. Bestimmung der Na⁺- und K⁺-Konzentration in Presssäften mit Hilfe der Flammenphotometrie

Gelöste Alkali- oder Erdalkalisalze werden nach Zerstäuben in eine stark 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.

Material: Flammenphotometer mit Zubehör, KCl-NaCl-Stammlösung zur Kalibrierung, **doppelt** zentrifugierte Presssäfte, Mikropipetten, zwölf 50 ml Zentrifugenröhrchen

Durchführung

Inbetriebnahme des Gerätes erfolgt durch den Praktikumsbetreuer

Vorsicht vor der heißen Flamme am Gerät!

Aufstellen der Eichgeraden

Es sind 6 Verdünnungen der NaCl-KCl-Stammlösung und A. dest. in Zentrifugenröhrchen anzusetzen (siehe Tabelle), die zur Kalibrierung des Photometers gemessen werden.

Stammlösung: 100 µM NaCl, 200 µM KCl

6 Ansätze zur Kalibrierung:

Nr.	Stammlösung [ml]	H ₂ O	c [µM]	c [µM]	Messwert Na	Messwert K
1	4	36				
2	8	32				
3	16	24				
4	24	16				
5	32	8				
6	40	-	100	200		

Messung der Presssäfte

Die doppelt zentrifugierten Presssäfte werden in je drei Ansätzen mit A. dest. verdünnt:

Pflanze	Verdünnung	V Presssaft [µl]	V H ₂ O [µl]	Messwert Na	Messwert K
Halophyt	1:5000				
	1:2000				
	1:1000				
Glykophyt	1:1000				
	1:500				
	1:100				

Die Verdünnungen werden direkt nach den Eichansätzen am Photometer gemessen.

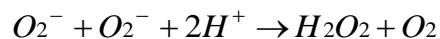
Berechnung der Na- und K-Konzentrationen und Auswertung

Aus den Messwerten (y-Achse) für Na und K der sechs Eich- bzw. Kalibrieransätze und den zugehörigen Konzentrationen (x-Achse) von K⁺ bzw. Na⁺ werden am Computer zwei entsprechende Diagramme zur Abbildung der beiden Kalibriergeraden erstellt. Mit Hilfe der Funktionen der Geraden sind die Kationenkonzentrationen für die verdünnten Presssäfte zu berechnen. Anschließend werden unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren die tatsächliche K⁺- und Na⁺-Konzentration der unverdünnten Presssäfte (in mM) berechnet. Die Ergebnisse sind vergleichend für die beiden Ionen und Pflanzentypen zu diskutieren.

Komplex 4 – Molekulare Pflanzenphysiologie

4.1. Nachweis der Superoxid Dismutase (SOD) in Pflanzenextrakten – **Demonstration der Ergebnisse**

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 – Gele werden zur Verfügung gestellt

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. Kämmen 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_4 -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 amylytischer 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 α -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 α -Amylaseaktivität (Stärkeabbau) induziert. Als Substrat werden stärkehaltige Agarplatten eingesetzt, denen zur Hemmung des Bakterien- und Pilzwachstums Antibiotika zugesetzt werden. Der Nachweis der amylytischen 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 μg /100 ml).
- b) stärkehaltiges Agarmedium wie unter a) mit Zusatz von 1 μM Gibberellinsäure (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 β -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 β -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 [Na_2HPO_4 pH 8,84 und NaH_2PO_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:

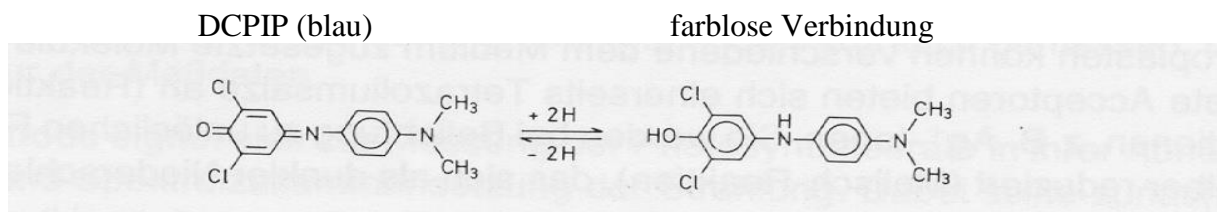
Zur Messung des Wasserpotentials der Kartoffelparenchymzellen ($\Psi_w = \Psi_\pi + \Psi_p$, bei undifferenzierten, gleichartigen, dehnbaren Zellen) bohrt man mit Hilfe eines Korkbohrers fünf (1 Kontrolle in A. dest. und vier Saccharosekonzentrationen) 6 bis 7 cm lange Stücke aus Kartoffeln heraus. Die 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.

5.3. Isolation von Chloroplastenfragmenten aus Pflanzenblättern zum Nachweis der Hill-Reaktion – Werte werden teilweise zur Demonstration zur Verfügung gestellt

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 Fe^{2+})

anstelle von 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 NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ - 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 (K₃Fe[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 Phosphat-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 BW	Ansatz 2 Messansatz	Ansatz 3 Dunkel-Kontrolle (Küvette verkleiden)	Ansatz 4 Licht-Kontrolle (ohne Chloroplasten)
Verdünnungspuffer	2,7 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,6 ml
DCPIP Stammlösung	-	100 µl	100 µl	100 µl
Verdünnte 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: 8.30 Uhr bzw. 13.00 Uhr

Ende: 12.00 Uhr bzw. 16.30 Uhr

Ort:

Praktikumsraum 3. OG, Einsteinstr. 3

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

Voraussetzung für die Teilnahme am Praktikum ist die besuchte Vorlesung Pflanzenphysiologie. **Weiterhin muss gewährleistet sein, dass den Corona-Regeln strikt gefolgt wird, kurz hier: keine Symptome, Abstand halten, Tragen einer Nasen-Mund-Bedeckung, möglichst FFP2 Masken, keine Anreise aus einem Hochrisikogebiet**

Die Studierenden werden in feste Gruppen mit jeweils 2 Mitgliedern eingeteilt.

Von jedem Studierenden sind folgende Sachen mitzubringen:

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

Kittel mit Namensschild

Möglichst FFP2 Maske oder äquivalenter Mund-Nasenschutz

Wasserfester Stift

Schreibzeug

Lineal

Taschenrechner

Datenstick

Pinzette

Schere

Notebook (1 pro Gruppe)

Rostock, 13.1.2021

Prof. Dr. Martin Hagemann