

Phyton (Austria)	Vol. 29	Fasc. 1	119–135	16. 5. 1989
------------------	---------	---------	---------	-------------

## Die Bestimmung der Photosynthesekapazität über die Chlorophyllfluoreszenz als Maß für die Streßbelastung von Bäumen

Von

H. R. BOLHAR-NORDENKAMPF\*, S. P. LONG\*\*, und E. G. LECHNER\*

Mit 9 Abbildungen

Eingelangt am 10. September 1988

Key words: Chlorophyll fluorescence,  $F_v/F_{max}$ , fluorimeters, stress detection.

### Summary

BOLHAR-NORDENKAMPF H. R., LONG S. P. & LECHNER E. G. 1989. The determination of the photosynthetic capacity using chlorophyll fluorescence to measure stress levels in trees. – *Phyton (Austria)* 29 (1): 119–135, with 9 figures. – German with English summary.

Recently, the registration of chlorophyll fluorescence induction following continuous excitation light and the more sophisticated Q-analysis using modulated light have been proved to be a versatile tool to assess disturbances of the photosynthetic capacity caused by diverse natural stresses. It seems likely, that this method is well suited for the detection of changes of the photosynthetic activity following the impact of air pollution alone as well as in combination with several natural stresses.

For this particular purpose three fluorimeters were tested, which became recently commercially available: 1. Plant Stress Meter, BioMonitor AB, Sweden; a portable, easy to manage fluorimeter for registration of induction parameters. 2. MFMS, Hansatech Ltd., U. K.; a portable modulated fluorimeter, capable of quenching-analysis. 3. PAM 101, Walz, FRG; modulated system, capable of quenching-analysis, determination of  $P_{700}$ -absorption and fluorescence relaxation kinetics. Detailed technical data of these instruments are given.

However, for comparison of the three fluorimeters only the parameter  $F_v/F_{max}$  ( $(F_{max} - F_0)/F_{max}$ ) was examined. Wheat leaves (*Triticum aestivum* cv. "Artus") were treated with Atrazine (2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazin).  $F_v/F_{max}$  of treated and untreated samples were compared. For comparison of the

\*) Prof. Dr. H. R. BOLHAR-NORDENKAMPF, Dr. E. G. LECHNER, Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Wien, Althanstraße 14, A-1091 Wien.

\*\*) Dr. S. P. LONG, Institute of Biology, University of Essex, Colchester CO4 3SQ, U. K.

induction pattern of plant material, which was affected by different levels of ambient air pollution, spruce branches (*Picea abies*) were collected in a number of different sites with documented levels of air pollution.  $F_v/F_{max}$  was registered after storage in a controlled environment. The results obtained from both experiments showed very good agreement between the three fluorimeters and demonstrate the high sensitivity of the method to detect the influence of varying levels of stress on photosynthesis in intact leaves or needles.

### Zusammenfassung

BOLHAR-NORDENKAMPF H. R., LONG S. P. & LECHNER E. G. 1989. Die Bestimmung der Photosynthesekapazität über die Chlorophyllfluoreszenz als Maß für die Streßbelastung von Bäumen. – *Phyton* (Austria) 29 (1): 119–135, mit 9 Abbildungen. – Deutsch mit englischer Zusammenfassung.

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz-Induktionskurve nach Vorverdunkelung (Kautsky-Kurve) sowie die „quenching“ – Analyse liefern zusammen mit der in den letzten Jahren entwickelten Interpretation des Fluoreszenzverhaltens detaillierte Informationen über die Aktivität der photosynthetischen  $CO_2$ -Fixierung in lebenden grünen Geweben. Bei der Diagnose von Streßeinflüssen auf das Photosynthese-geschehen hat sich die Fluoreszenzmessung bereits bewährt und methodisch Vorteile gegenüber den traditionellen Gasstoffwechselfmessungen erkennen lassen. Fluoreszenzmeßgeräte für streßphysiologische Untersuchungen im Laboratorium und für das Freiland sind in letzter Zeit vielfach auf den Markt gekommen. Drei derartige Geräte werden nachstehend getestet und verglichen: 1. Plant Stress Meter, Bio Monitor AB, Umea Schweden, ein tragbares Gerät zur Messung von „Kautsky“-Kurven; 2. MFMS, Hansatech, Ltd., King's Lynn, U. K., ein tragbares Gerät mit moduliertem Licht; 3. PAM 101, H. Walz, Effeltrich, BRD, ein hochentwickeltes transportierbares Gerät mit moduliertem Licht und diversen Zusatzeinrichtungen. Ausführliche technische Daten der drei Instrumente werden angegeben.

Die Anwendung von moduliertem Licht bei MFMS und PAM ermöglicht eine „quenching“ Analyse. Insbesondere das vielfältige PAM konnte nicht völlig getestet werden; um die Vergleichbarkeit zu gewähren, wurde nur die bekannte Kenngröße  $F_v/F_{max}$  berücksichtigt.

Für den Vergleichstest wurden Weizenblätter (*Triticum aestivum* cv. ‚Artus‘) mit dem Herbizid Atrazin behandelt und die „fast kinetics“ der Chlorophyllfluoreszenz gemessen. Messungen wurden auch mit Fichtennadeln von Standorten mit unterschiedlicher Luftschadstoffbelastung durchgeführt. Die Ergebnisse aus beiden Experimenten zeigten gute Übereinstimmung und bestätigen, daß die Messung der Chlorophyllfluoreszenz eine gute Methode ist, streßbedingte Störungen der Photosynthese zu detektieren.

### Vorwort

Zur Diagnose von Waldschäden werden neue Methoden gesucht, welche Auskunft über den physiologischen Zustand der Bäume geben können. Aus streßphysiologischen Untersuchungen ist bekannt, daß es mittels der Messung der Chlorophyllfluoreszenz möglich ist, den Einfluß von natürlichen Stressoren, wie Temperatur, Licht und Trockenheit, auf die physiolo-

gische Aktivität der Pflanzen nachzuweisen. Aufgrund dieser methodischen Sensitivität scheint es wahrscheinlich, daß eine Änderung der physiologischen Aktivität, welche durch die Einwirkung von Luftschadstoffen bedingt ist, ebenso nachzuweisen ist, wie ein kombinierter Einfluß verschiedener Stressoren.

### Einleitung

Das rote Fluoreszenzlicht einer mit UV- oder Blaulicht bestrahlten Chlorophylllösung diente seit Jahrzehnten dazu, die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieses ubiquitären organischen Farbstoffmoleküls zu erklären. Mit der Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie wurde bald deutlich, daß Chloroplasten in lebenden grünen einzelligen und Geweben eine dem Chlorophyllgehalt proportionale Rotfluoreszenz zeigen. Trotzdem waren sich vor 50 Jahren die Forscher nicht klar darüber, daß alle grünen Pflanzen auch im Sonnenlicht rotes Fluoreszenzlicht aussenden müssen. Bei den ersten orientierenden Messungen stellte man völlig unerwartet fest, daß mit dem Auftreffen von Licht auf ein grünes Blatt die Emission von rotem Fluoreszenzlicht nicht einfach angeschaltet wird, sondern eine variierende Induktionskinetik vom Millisekunden- bis in den Minutenbereich beobachtbar ist (KAUTSKY & HIRSCH 1934). Die Vermutung lag nahe, daß diese recht unterschiedlichen Induktionskurven ein Resultat der verschiedenen rasch anlaufenden photosynthetischen Prozesse sind, eine geeignete Interpretation war jedoch durch die fehlenden molekularbiologischen Grundlagen vorerst nicht möglich.

Tatsächlich ist die Chlorophyllfluoreszenz ein Teil des im wesentlichen vom Photosystem II absorbierten Sonnenlichtes, der nicht für die Produktion von Assimilationskraft zur CO<sub>2</sub>-Fixierung verwendet wird. Die Intensität der Chlorophyllfluoreszenz ist somit teilweise invers proportional zur photosynthetischen Aktivität (LAVOREL & ETIENNE 1977, KRAUSE & WEIS 1984, RENGER & SCHREIBER 1986). Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz an Chloroplastensuspensionen, grünen Blättern und Nadeln dient jedoch nicht nur der photosynthetischen Grundlagenforschung, sondern ist auch ein brauchbares Werkzeug geworden, um Störungen im photosynthetischen Geschehen, hervorgerufen durch die natürlichen Stressoren Kälte, Licht, Hitze, Trockenheit und Wind, aber auch durch Luftschadstoffe und Herbizide, zu erfassen (SCHREIBER & BILGER 1987, BAKER & HORTON 1988, STRAND & ÖQUIST 1988).

Bis jetzt waren die Geräte zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz ziemlich voluminös und auch schwierig zu bedienen. In letzter Zeit jedoch wurden tragbare und leicht transportierbare Geräte entwickelt, welche Serienuntersuchungen im Freiland zulassen sollten.

Im Jahre 1987 haben die Bundesministerien für Wissenschaft und Forschung sowie für Land- und Forstwirtschaft zusammen mit dem öster-



reichischen Forstverein und Monitor Labs Umweltmeßtechnik einen internationalen Workshop am Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Wien unterstützt. Das Ziel dieses Workshops war eine vergleichende Untersuchung dieser Geräte bezüglich ihres Potentials für die Detektierung von natürlichem und anthropogenem Streß (BOLHAR-NORDENKAMPF & al. 1988).

### Theorie

Die Lichtenergie, die durch die Chlorophyllmoleküle absorbiert worden ist, wird zum Betreiben der Photosynthese benutzt, als Wärme desaktiviert oder als Fluoreszenzlicht abgestrahlt. In einem theoretisch optimalen Zustand werden ungefähr 80% der absorbierten Energie photochemisch genutzt, wobei 19,5% Wärme und 0,5% als Fluoreszenzlicht verloren gehen. Ist die Nutzung der Energie in der photosynthetischen  $\text{CO}_2$ -Fixierung nicht möglich, werden z. B. 97,5% als Wärme und 2,5% als Fluoreszenz abgestrahlt. Bei Raumtemperatur erfolgt die Emission des Fluoreszenzlichtes mit 695 nm hauptsächlich von den Chlorophyll-a-Molekülen im Photosystem II (PSII) der Elektronentransportkette, welche Lichtenergie in chemische Energie wandelt.

Die kontinuierliche Fluoreszenz einer grünen Pflanze während des Tages enthält nur wenig Information, da die Bestimmung der absoluten Intensität des Fluoreszenzlichtes aufgrund der Eichproblematik schwierig ist. Bei Belichtung des Pflanzenmaterials mit einer geänderten Lichtintensität zeigt die Fluoreszenz eine Kautsky-Induktionskurve, die in ihren

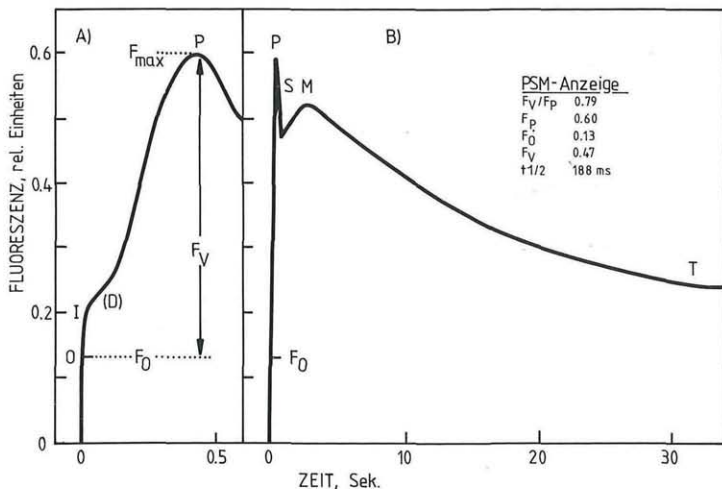


Abb. 1: Eine typische Chlorophyllfluoreszenzkurve nach KAUTSKY, gemessen an dunkeladaptierten Nadeln von *Pinus sylvestris*. A = schnelle Kinetik, B = langsame Kinetik. Die typische Kurvenniveaus sind mit O-I-D-P-S-M-T bezeichnet. PSM-Fluorimeter bei 20°C und 100  $\mu\text{mol. Photonen. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Abschnitten mit O-I-D-P-S-M-T (PAPAGEORGIOU 1975, LAVOREL & ETIENNE 1977) bezeichnet wird (Abb. 1). Die Interpretation dieser Induktionskurve ist sehr komplex und beruht auf molekularbiologischen und physikochemischen Erkenntnissen der letzten Jahre (KRAUSE & WEIS 1984, ÖGREN & BAKER 1985, BUSCHMANN 1986, BRIANTAIS & al. 1986, RENGER & SCHREIBER 1986). Als  $F_0$ -Level wird jene minimale Fluoreszenzrate bezeichnet, welche bei maximal oxidiertem  $Q_A$  (= primärer Quencher des PS II, vgl. DUYSSENS & SWEERS 1963) eine optimale photochemische Nutzung des einfallenden Lichtes ermöglicht. Die Fluoreszenzlöschung, i. e. eine Verminderung der Fluoreszenz, im Englischen als „quenching“ bezeichnet, ist einerseits bedingt durch die photochemische Nutzung der Energie, andererseits durch die Wärmeabgabe.  $F_0$  wird als Bezugsgröße für die anderen Kardinalpunkte der Kurve herangezogen (HIPKINS & BAKER 1986).

Bei Belichtung mit starkem kontinuierlichem Erregerlicht steigt die Fluoreszenz nach dem Erreichen des  $F_0$ -Levels innerhalb von 1–2 s auf einen maximalen Wert,  $F_{\max}$ , an. Zu diesem Zeitpunkt ist  $Q_A$  völlig reduziert, d. h. die Elektronentransportkette kann keine Elektronen aufnehmen und die einfallende Lichtenergie wird nur über Wärme und Fluoreszenz desaktiviert und kann nicht photochemisch genutzt werden. Die Fluoreszenzlöschung wird hier nur durch Wärmeabgabe bestimmt. Der Anstieg der Kurve von  $F_0$  auf  $F_{\max}$  kann eine annähernd sigmoidale Verflachung aufweisen, welche als I=inflection, gefolgt von einem dip=D, bezeichnet wird. Die Fluoreszenzlöschung in diesem Abschnitt der Kurve ist durch photochemisches quenching bedingt: durch Reduktion der Elektronenakzeptoren nach  $Q_A$  kommt es zu einer Reoxidation von  $Q_A$ , wodurch die photochemische Nutzung der Elektronentransportkette momentan erhöht wird.

Die Differenz zwischen  $F_0$  und  $F_{\max}$  wird als variable Fluoreszenz  $F_v$  bezeichnet und als Verhältnis  $F_v/F_{\max}$  angegeben. Bei ungestörten Systemen ergeben sich Werte von 0,75–0,85, die direkt proportional der Lichtnutzung in der Sauerstoffentwicklung und unter Normalbedingungen der  $CO_2$ -Fixierung sind (quantum yield: [Moleküle abgegebenes  $O_2$  bzw. fixiertes  $CO_2$ ]: [absorbierte Photonen], BUTLER & KITAJIMA 1975). Der Wert  $F_v/F_{\max}$  ist daher ein gutes Maß für mögliche Störungen der photochemischen Lichtnutzung. Diese photosynthetische Kapazität wird durch verschiedenste Stressoren stark beeinflusst; insbesondere die durch ein Überangebot von Licht hervorgerufene Photoinhibition kann gut erfaßt werden, aber auch Temperatur- und Trockenstreß und sogar biotische Einflüsse wie Pilzinfektion (KECK & BOYER 1974, BAKER & al. 1983, STRAND & ÖQUIST 1985, BONGI & LONG 1987).

Die Interpretation der Induktionskurve nach  $F_{\max}$  in Beziehung zum Gasstoffwechsel ist schwierig und zeitlich aufwendiger. Durch die Analyse der Fluoreszenzlöschung (Q-Analyse) kann das Verhältnis zwischen den beiden konkurrierenden Mechanismen der Energiedesaktivierung Wärme

und Fluoreszenz erfaßt werden (HIPKINS & BAKER 1986, SCHREIBER & al. 1986). Dadurch ist eine Aufgliederung in photochemische Fluoreszenzlöschung =  $q_p$  und nicht-photochemische Fluoreszenzlöschung =  $q_{NP}$  möglich, welche indirekt Aufschluß über die Aktivität der  $CO_2$ -Fixierung gibt.

Gleichzeitig mit dem Auftreten des Sekundärpeaks M setzt die  $CO_2$ -Fixierung ein. Danach kommt es zum kontinuierlichen Abfall der Fluoreszenzintensität, wobei innerhalb von Minuten ein Terminal-Level-T erreicht wird. Dieser Steady-State-Level der Fluoreszenzabgabe fällt zeitlich mit dem Erreichen einer steady state- $CO_2$ -Fixierungsrate zusammen.

Die Induktionsphase der Chlorophyllfluoreszenz gliedert sich somit in zwei Abschnitte: der Anstieg von  $F_0$  auf  $F_{max}$  wird als „schnelle Kinetik“ = „fast kinetics“ bezeichnet, sie ist größtenteils durch die Kapazität des PS-II-Komplexes bedingt und kann als Maß für den Aufbau der Assimilationskraft verwendet werden. Die Phase nach  $F_{max}$  bis zum Erreichen von T wird als „langsame Kinetik“ = „slow kinetics“ bezeichnet und enthält Informationen über die Aktivität der  $CO_2$ -Fixierung im Calvin-Cyclus (SCHREIBER & BILGER 1987, WALKER 1987).

### Messtechnik

Die Interpretation von Induktionskurven der Chlorophyllfluoreszenz mit kontinuierlichem Erregerlicht basiert auf der Annahme, daß die Messungen mit dunkeladaptierten Blättern durchgeführt werden. Bei gesunden normalen Blättern und Nadeln ist eine Vorverdunkelung von 15–30 Minuten ausreichend (LARCHER & CERNUSCA 1985), bei durch Streß belastetem Material kann sich jedoch die nötige Verdunkelungszeit verlängern. Die so vorbehandelten Blätter werden mit einer rotlichtfreien Lichtquelle bestrahlt, die Induktionskinetik mit einer Photodiode gemessen und mittels eines Speicheroszilloskopes mit Potentiometerschreiber oder direkt mit einem Mikrocomputer aufgezeichnet (Abb. 2 A).

Obwohl solche Meßsysteme relativ einfach und leicht verständlich sind, ist ihr Einsatz durch die nötige Dunkeladaptierung des Materials und die Empfindlichkeit gegenüber dem Rotlichtanteil im normalen Tageslicht begrenzt. Zusätzlich gibt es Interpretationsschwierigkeiten, da der Meßlichtstrahl gleichzeitig das Anregungslicht ist und daher die Größe des angeregten Kollektivs von Chlorophyllmolekülen mit der Lichtintensität variiert.

Diese Limitierungen werden durch den Einsatz von modulierten Systemen weitgehend ausgeschaltet. Ein sehr schwacher Lichtstrahl wird mit einer Frequenz bis zu 100 KHz auf das Meßobjekt gerichtet und nur jene Fluoreszenz gemessen, welche mit derselben Frequenz abgegeben wird (Abb. 2 B). Eine durch eine zusätzliche Lichtquelle oder das Tageslicht induzierte kontinuierliche Fluoreszenz geht daher nicht in die Messung ein. Setzt man extrem schwaches moduliertes Licht ein ( $10^{-2}$   $\mu$ mol. Photonen

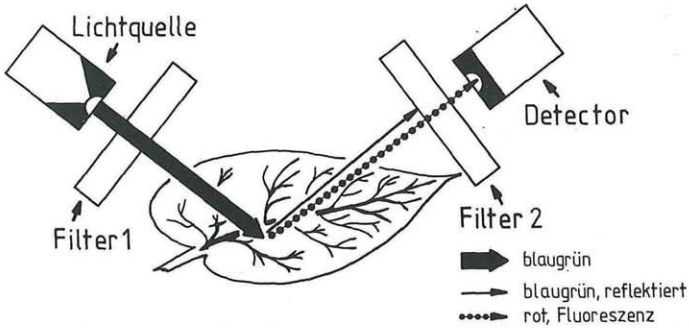


Abb. 2A: Fluorimeter mit kontinuierlichem Erregerlicht. Die punktierte Linie symbolisiert das abgestrahlte Fluoreszenzlicht, die durchgezogene Linie das Meßlicht.  $F_1$  = Kurzpaßfilter,  $F_2$  = Langpaßfilter, L = Meßlicht, D = Empfänger. Das auf das Blatt auftreffende Meßlicht hat durch den Kurzpaßfilter keinen Rotanteil, die das rote Fluoreszenzlicht messende Photodiode ist durch ein Langpaßfilter vom blaugrünen Meßlicht abgeschirmt. Das Meßlicht muß immer eine kürzere Wellenlänge haben als das emittierte Fluoreszenzlicht. Ein solches Instrument mißt jede Fluoreszenz des PSII, gleichgültig ob das Meßlicht oder eine Hintergrundbeleuchtung die Chlorophyllmoleküle getroffen hat.

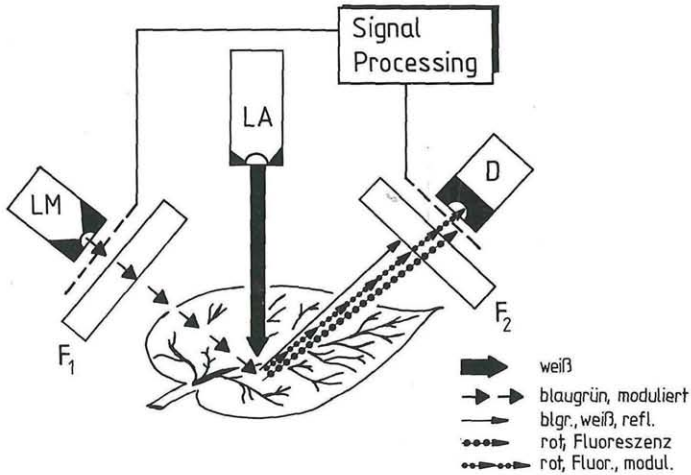


Abb. 2B: Fluorimeter mit moduliertem Meßlicht. Die Lichtquelle gibt das Meßlicht (LM) in gepulster Form ab. Durch einen entsprechenden Empfänger (D) wird nur das gepulste Fluoreszenzsignal gemessen. Das zusätzliche Erregerlicht (LA) kann daher jede Wellenlänge haben und somit auch weißes Tageslicht sein.

$m^{-2} \cdot s^{-1}$ ), dann wird keine Fluoreszenzinduktion ausgelöst, das System verbleibt im Zustand des  $F_0$  mit maximalem photochemischen Potential. Durch ein entsprechend starkes kontinuierliches Anregungslicht (actinic light) wird die Induktionskinetik ausgelöst und auch über die modulierte Frequenz meßbar. In der Folge kann durch saturierende Lichtblitze im



Rahmen einer Q-Analyse die Stärke der Fluoreszenzlöschung durch  $q_p$  und  $q_{NP}$  untersucht werden (Abb. 3).

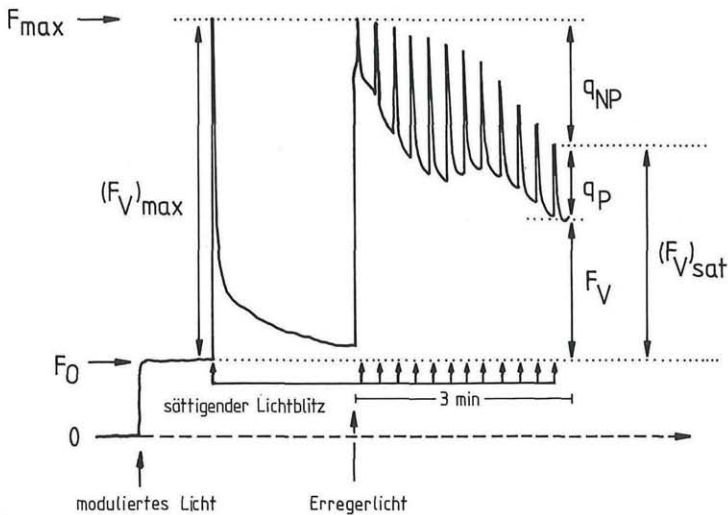


Abb. 3: Definition der Quenching-Koeffizienten und Terminologie der charakteristischen Fluoreszenzparameter bei Messung mit modulierten Fluorimetern. Durch ein extrem schwaches moduliertes Meßlicht wird  $F_0$  direkt meßbar.  $F_{max}$  wird bei einer dunkeladaptierten Probe durch einen saturierenden Lichtpuls bestimmt.  $(F_v)_{max}$  ist die maximale variable Fluoreszenz. Die Fluoreszenzlöschung als photochemischer Quench ( $q_p$ ) und nicht-photochemischer Quench ( $q_{NP}$ ) werden nach der Induktion mit dem Erregerlicht (actinic light) durch kurze saturierende Lichtblitze meßbar.  $(F_v)_{sat}$  ist die variable Fluoreszenz induziert durch den Lichtblitz (verändert nach SCHREIBER & al. 1986).

## Messgeräte

### Fluorimeter 1: PSM. BioMonitor AB

Das Gerät mißt die schnelle und langsame Kinetik der kontinuierlichen Fluoreszenz von dunkeladaptierten Blättern und Nadeln sowie von Algen-suspensionen unter Verwendung eigens konstruierter Blatthalter (ÖQUIST & WASS 1988). Über den eingebauten Mikroprozessor werden sofort nach jeder Messung die Werte  $F_0$ ,  $F_{max}$ ,  $F_v$ ,  $F_v/F_{max}$  und  $t_{1/2}$  ausgegeben, wobei der letzte Wert die Halbzzeit bis zum Erreichen von  $F_{max}$  in Millisekunden angibt. Bis zu 1000 Werte können im Memory gespeichert werden. Das Gerät läßt sich umhängen und wird über ein Keyboard bedient, die Meßwerte können direkt auf einem LCD-Display abgelesen werden. Ein Wechselbetrieb mit aufladbaren NiCd-Batterien oder aber über das Netz ist möglich (Abb. 4).



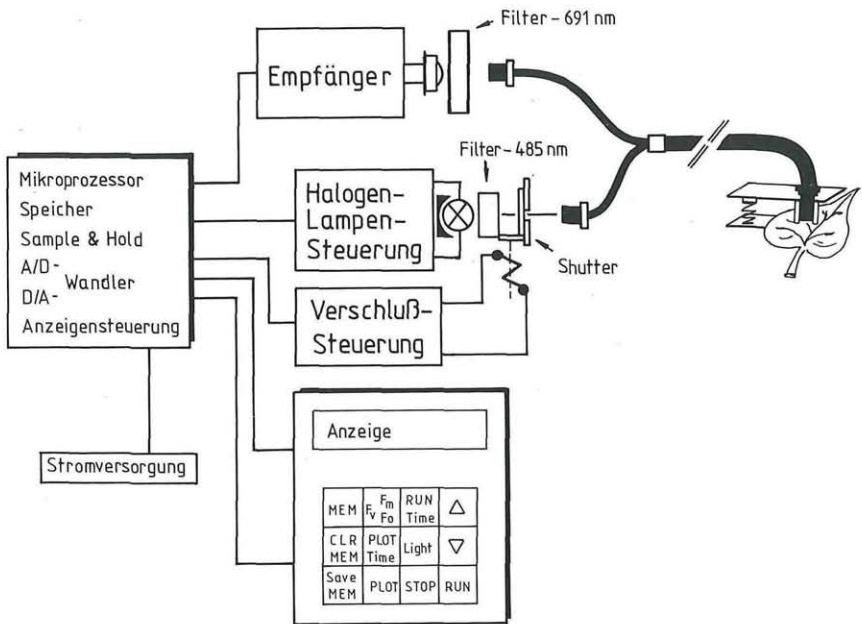


Abb. 4: Blockdiagramm der Hauptkomponenten des BioMonitor PSM-Fluorimeter.

## Fluorimeter 2: MFMS, Hansatech

Dieses Meßsystem arbeitet mit moduliertem Licht und kann daher für die Aufnahme von Induktionskurven und für Q-Analysen verwendet werden. Als Zusätze werden Lichtquellen für das Anregungslicht und den saturierenden Blitz benötigt. Dadurch kann das Gerät, obwohl batteriebetrieben, nicht mehr bequem von einem Mann von Meßpunkt zu Meßpunkt getragen werden. Die Meßkammer ist völlig offen, so daß die Messungen im Tageslicht bei Standortbedingungen durchgeführt werden können. Ein LED-Display zeigt nur den aktuellen Meßwert an, für eine genaue Auswer-

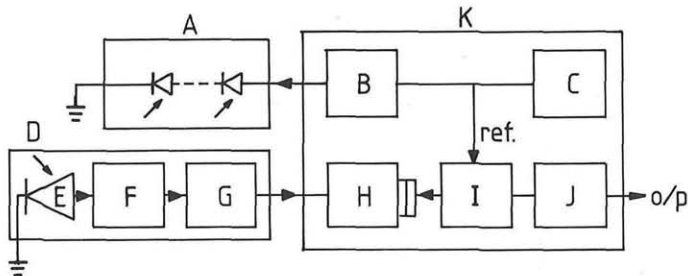


Abb. 5: Blockdiagramm der Hauptkomponenten des Hansatech MFMS-Fluorimeter. A = LED-Beleuchtung, B = LED-Steuerung; C = Modulator, D = Empfänger, E = Photodiode, F = Strom-Spannungswandler; G = highpass Filter; H = Verstärker; I = Demodulator, J = Ausgangspuffer, K = Kontrolle.

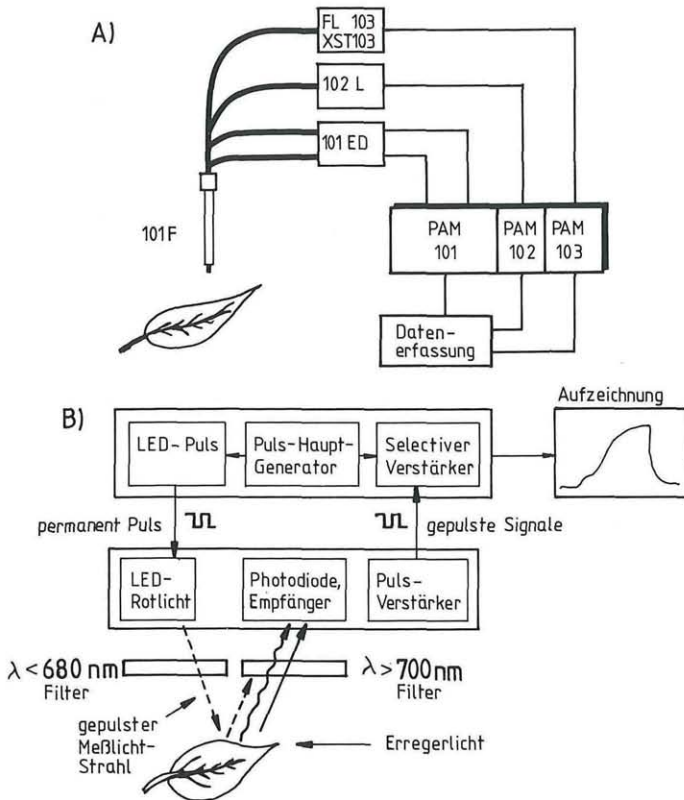


Abb. 6: Blockdiagramm des PAM Chlorophyllfluoreszenz-Meßsystems. A: Organisationsschema. Glasfaseroptiken (101 F) verbinden die Probe mit der Emitter-Detektor-Einheit (101 ED). Ein zusätzliches Glasfaserbündel erlaubt eine Erregerbeleuchtung über LED (101 L), über eine Sättigungspuls-Lampe (FL 103) oder eine Xenonblitzlampe (XST 103). Das PAM 101 ist die Hauptkontrollereinheit, welche mit 101 ED und 101 F die Minimalversion darstellt. Die zusätzlichen Module PAM 102 und 103 können im Gehäuse PAM 101 untergebracht werden. Sie kontrollieren die Erregerlichtquelle (101 L) zur Registrierung der raschen Induktionskinetik, die Sättigungspuls-Lampe (FL 103) für die Q-Analyse und die Blitzlampe (FL 103) zum Studium der Relaxationskinetik am PSII. Die Datenaufzeichnung kann analog auf einem Schreiber, aber auch gesteuert vom PAM 102, 103 auf einem IBM-kompatiblen PC oder auf einer eigens entwickelten Datenerfassung erfolgen. B: Schematische Skizze des PAM zur Beschreibung des Meßprinzips: Das System basiert auf dem „Pulse-Amplitude-Modulation-Prinzip“. Die Fluoreszenz der Probe wird durch Lichtpulse mit einer Frequenz von 1,6–10 KHz angeregt. Das extrem schwache Meßlicht mit ca. 650 nm passiert ein Kurzpaßfilter um langwelliges Rotlicht abzuhalten. Ein Langpaßfilter vor der Photodiode verhindert eine Messung des Streulichtes der Meßbeleuchtung. Das modulierte Fluoreszenzsignal wird von einer Photodiode aufgenommen und in zwei Schritten über einen Pulsverstärker und einen selektiven „window amplifier“ verstärkt. Diese Anordnung läßt die Auflösung von geringsten Fluoreszenzintensitäten auch bei stärkstem ungefiltertem Hintergrundlicht zu.

tung müssen daher die Werte zumindest über einen Schreiber dokumentiert werden (Abb. 5).

### Fluorimeter 3: PAM, H. Walz

Dieses modulierte Meßgerät ist in Modulbauweise konzipiert und läßt nicht zuletzt wegen des mit verschiedenen Frequenzen arbeitenden selekti-

Tabelle 1

Gerätevergleich. PSM = Plant-Streß-Meter BioMonitor, Schweden (Monitor Labs-Umweltmeßtechnik, Mödling); MFMS = Modulated-Fluorescence-Measurement-System, Hansatech Ltd. Kings Lynn Norfolk PE 304 NE. U. K.); PAM = Chlorophyll-Fluorescence-Measuring-System. Heinz Walz, Effeltrich D-8521.

	1. PSM	2. MFMS	3. PAM 101
Measurements			
$F_0, F_{max}, F_V$	+	+	+
$t_{1/2}$	+	1	1
$q_p$	n/a	2	3
Light sources			
Modulated beam $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	n/a	yellow light emitting photodiode (583 nm) 0 - 8	red light emitting photodiode (655 nm) $10^{-2} - 10$
Modulation frequency		870 kHz	1.6 - 100 kHz
Actinic beam $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0 - 600	up to 1500	up to $10^3$
Saturating beam $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	n/a	n/a	up to $10^3$
Photodetector	Hamamatsu G1737 photodiode	Photodiode	PIN photodiode
Filter	690 nm interference	700 nm interference	700 nm
Amplifier	current to voltage converter	Frequency	selective window amplifier
Time resolution	3 ms	0.65 ms	100 kHz
Display	LCD	LED	LCD or LED
On-board calculations	$F_{max}, F_0, F_V,$ $F_V/F_{max}, t_{1/2}$	none	in connection with data acquisition system
Output	analogue 0 - 5 V	analogue 0 - 2 V	analogue 0 - 4 V
Computer interface/ software	RS-232	n/a	IBM compatible PC
Microprocessor	CMOS Hitachi HD6309E	n/a	n/a
Power supply	12 V battery or 110/220 V AC	12 V DC-sealed lead acid or 240/110 V AC	12 V battery or 110/220 V
Data logger		none	TRA 101
Length of continuous use from batteries	500 x 5 s measurements	ca. 30 h	300 h
Weight kg	4.3	3	7
Length x width x height cm	26 x 25 x 14	26 x 24 x 10	53 x 28 x 15
Second light source	n/a	PLS-1	TI 101

ven „window amplifiz“ neben der Messung von Induktionskurven und einer detaillierten Q-Analyse auch die Bestimmung von Abklingkurven zu. Zusammen mit einem tragbaren PC ist es ein komplettes ausgereiftes System, das die gewonnenen Daten auch verrechnen und graphisch darstellen kann. Im Prinzip kann das System von Batterien aus betrieben werden, ist jedoch bei Ausnutzung aller angebotenen Möglichkeiten eher ein Standgerät für Freilandlaboratorien (Abb. 6).

In der Tabelle 1 sind die wesentlichen Merkmale der drei Geräte übersichtlich zusammengestellt.

### Vergleichsmessungen

Atrazin (2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazin) ist ein Herbizid, welches direkt am QB-Protein des Photosystem II bindet und den Elektronentransport und damit die photochemische Nutzung des absorbierten Lichtes verhindert. Im Freiland gezogener Winterweizen wurde mit 0,35 g/l Atrazin behandelt, worauf die Photosyntheseraten bestimmt wurden. Bereits 30 Minuten nach der Applikation konnte keine  $\text{CO}_2$ -Fixierung mehr festgestellt werden. Die durchgeführten Fluoreszenzmessungen zeig-

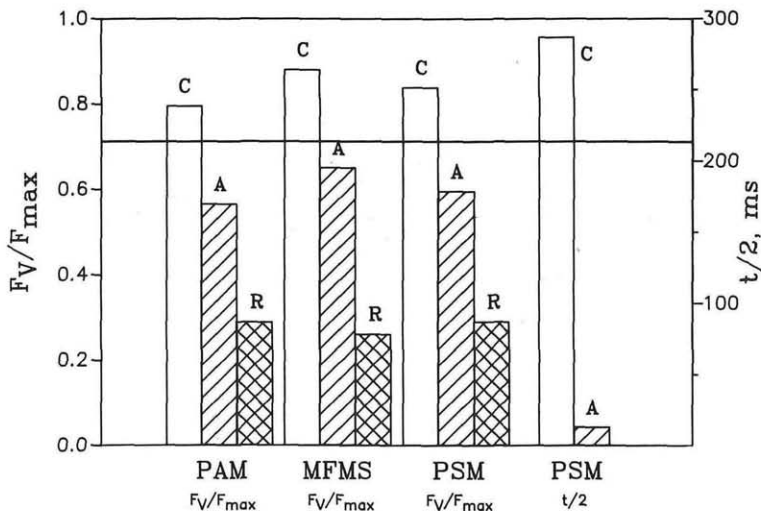


Abb. 7: Das Verhältnis der variablen zur maximalen Fluoreszenz ( $F_v/F_{max}$ ) und die Halbzzeit des Anstieges auf P ( $t_{1/2}$ ), bei Winterweizen (*Triticum aestivum* cv. Artus). C = Kontrolle, A = 0,35 g/l Atrazin, R = Reduktion des  $F_v/F_{max}$ -Wertes durch Atrazin als Verhältnis (C-A)/A. Die Initialen unter den Blöcken bezeichnen das verwendete Fluorimeter. Die Photosyntheseraten der Kontrollblätter betragen bei 20°C und 600  $\mu\text{mol}$  Photonen  $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  8,0  $\mu\text{mol}$   $\text{CO}_2$   $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , während die atrazinbehandelten Blätter eine Atmungsrate von -2,5  $\mu\text{mol}$   $\text{CO}_2$   $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  zeigten. — =  $F_v/F_{max}$  - Grenzwert für eine mögliche Störung.



ten deutlich die Störung im Photosyntheseapparat, wobei die Ergebnisse bei allen drei Geräten vergleichbar sind (Abb. 7).

In der Folge wurden Zweigproben von verschiedenen Lokalitäten mit den Geräten untersucht. Bei dem Vergleich von drei Standorten aus Tirol mit unterschiedlicher Schadstoffbelastung ergab sich eine gute Übereinstimmung mit der forstlichen Ansprache und der durch die Chlorophyllfluoreszenz ausgewiesenen Störung im Photosynthesegeschehen (Abb. 8).

### Bewertung

Die Auswahl des passenden Gerätes wird nicht nur von der Fragestellung her bestimmt, sondern auch von der Bereitschaft des Experimentators, sich mit der Interpretation der Fluoreszenzmeßwerte näher zu beschäftigen. Soll die Fluoreszenzmessung nur der Feststellung von Störungen der Photosynthese durch verschiedene Stressoren dienen, dann wird sich für die Freilandarbeit das leicht tragbare PSM empfehlen. Das Gerät wird komplett mit den Blatthaltern zur Vorverdunkelung geliefert und man ist bei entsprechender Planung des Meßablaufes in der Lage, jede Minute eine Messung direkt an der Pflanze durchzuführen. Sollte sich jedoch zur näh-

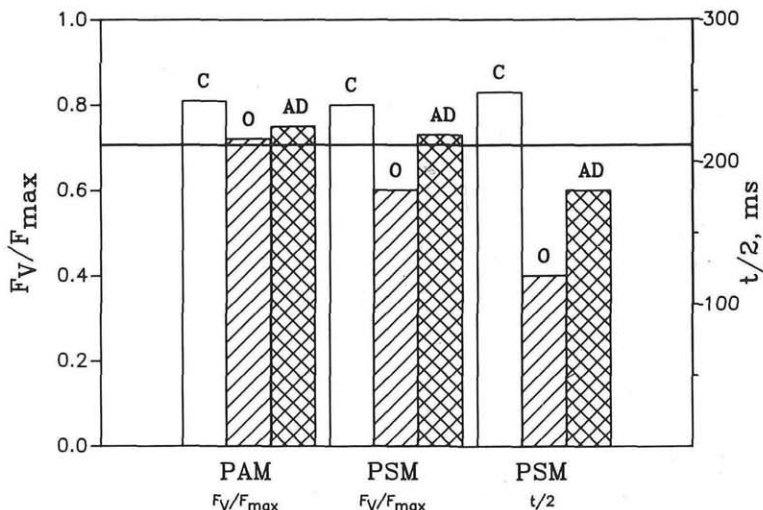


Abb. 8: Das Verhältnis der variablen zur maximalen Fluoreszenz ( $F_v/F_{max}$ ) und die Halbzzeiten des Anstieges auf P ( $t_{1/2}$ ) bei Fichtenproben (*Picea abies* [L.] KARST.) von drei verschiedenen Lokalitäten in Tirol. C = kaum belasteter Standort bei Matriei 1400 m, O = Lokalität auf 1800 m in der Nähe von Innsbruck mit einer Ozonbelastung bis zu 70 ppb als Tagesmittelwert, AD = Lage auf 1200 m bei Bieberwurf auf armem Boden mit erhöhtem Säureeintrag. Es sind die Daten vom PAM und PSM dargestellt, obwohl die Schreiberaufzeichnungen des MFMS vergleichbare Informationen lieferten. — =  $F_v/F_{max}$  - Grenzwert für eine mögliche Störung.

ren Abklärung der Störungsursache eine Q-Analyse oder die Messung von  $F_v/F_{\max}$  bei Tageslicht als notwendig erweisen, muß ein moduliertes System verwendet werden.

Das MFMS würde im Prinzip den Zweck erfüllen, ist jedoch in der Bedienung gewöhnungsbedürftig und wird ohne Datenaufzeichnung geliefert. Das Gerät ist das preiswerteste, gerade noch tragbar und kann dank seiner Flexibilität und bei einigem Geschick für viele Zwecke eingesetzt werden.

Das komplette PAM 101 läßt kombiniert mit PAM 102, PAM 103 sowie der Datenerfassung TRA 100 und den verschiedenen Beleuchtungseinheiten wesentlich mehr Meßmöglichkeiten zu, als das im Prinzip ähnlich konzipierte MFMS. Um das Gerät wirklich voll ausnutzen zu können, ist ein fundiertes Wissen der physikochemischen und molekularbiologischen Hintergründe der Chlorophyllfluoreszenz nötig. Natürlich eignet sich dieses vielseitige Gerät insoferne auch für Messungen im Freiland, wenn Proben geworben und rasch zum Meßplatz gebracht werden können.

### Anwendung

Die Chlorophyllfluoreszenz zeigt bereits geringste temporäre oder chronische Störungen im Photosynthesegeschehen an, wobei teilweise unabhängig von der aktuellen Photosyntheserate die Kapazität der photochemischen Energiekonversion bestimmt werden kann. Nachdem die natürlichen Stressoren Licht und Temperatur, aber auch Trockenheit, die Photosynthese beeinflussen, läßt sich die Einwirkung eines dieser Stressoren oder einer Streßkombination mittels der Chlorophyllfluoreszenz nachweisen. Dabei kann zum Beispiel der Einfluß des Winterstreß auf immergrüne Koniferennadeln verfolgt und auch die Erholung im Frühjahr dokumentiert werden. (Abb. 9, BOLHAR-NORDENKAMPF & LECHNER 1988 a, b).

Da auch die Einwirkung von Luftschadstoffen einen störenden Einfluß auf die photosynthetische Aktivität ausüben kann, macht sich auch dieser Einfluß in den Fluoreszenzdaten bemerkbar. Das Problem liegt somit nicht in der Diagnose einer Streßbelastung, sondern vielmehr in der Suche nach einer ursachenspezifischen Diagnose der Streßbelastung. Dazu muß man berücksichtigen, daß in vollem Sonnenlicht nach wenigen Stunden jede gesunde Fichte eine vorübergehende Störung als Photoinhibition erkennen läßt und im jahreszeitlichen Wechsel während des Winters neben starker Photoinhibition auch Chlorophyllabbau und Zerstörungen im Photosyntheseapparat vorkommen, welche vor allem durch die Einwirkung natürlicher Stressoren, wie niedere Temperaturen und Starklicht, bedingt sind.

Die Gefahr der zusätzlichen Belastung durch primäre und sekundäre Luftschadstoffe liegt hauptsächlich darin, die Belastungssituation während der natürlichen Streßperioden durch die zusätzliche Einwirkung von Luftschadstoffen zu verschärfen, sodaß akkumulierende Schäden entwickelt

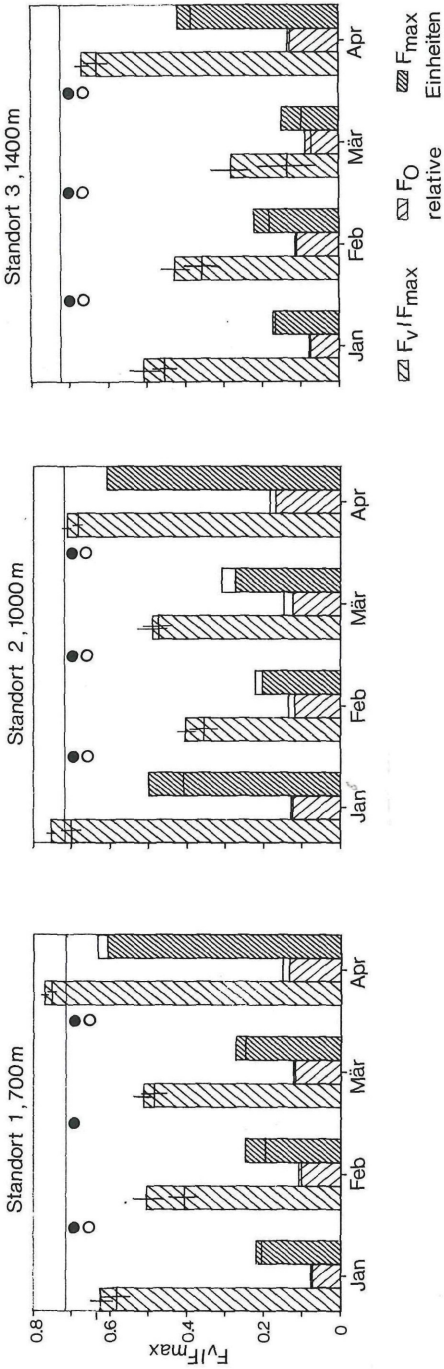


Abb. 9: Charakteristika der schnellen Fluoreszenzinduktion  $F_v/F_{max}$  während des Winters bei Fichte. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte des Nadeljahrganges 1986, die Querlinie jene des Jahrganges 1987. Eingezeichnet ist das Konfidenzintervall ( $p < 0,1$ ) für  $F_v/F_{max}$ . Signifikante Unterschiede der Werte zwischen aufeinanderfolgenden Monaten wurden mit dem t-Test ermittelt ( $p < 0,1$ ); ● = Nadeljahrgang 1987, ○ = Nadeljahrgang 1986. Die Messungen wurden an den Standorten des Höhenprofils Zillertal der forstlichen Bundesversuchsanstalt mit einem PSM-Fluoreszenzmeßgerät (BioMonitor) durchgeführt. Die Linie bei 0,72 ist der  $F_v/F_{max}$ -Grenzwert für eine mögliche Störung).

werden. Es wird zu prüfen sein, in welchem baumphysiologischen Zustand Messungen der Chlorophyllfluoreszenz im Freiland am meisten Information liefern und wie die Methode zu standardisieren ist. Trotzdem kann die Messung der Fluoreszenz neben der Bestimmung von Gasstoffwechsel- und Transpirationsraten als rasche, zerstörungsfreie Methode zur Erfassung der Streßbelastung eines Baumes angesehen werden. Der Vorteil der Fluoreszenzmessungen liegt in ihrer raschen Durchführbarkeit und der Möglichkeit, die Messungen auch unter ungünstigen Witterungsbedingungen durchzuführen.

#### Danksagung

Die Tagung wurde von den Bundesministerien für Wissenschaft und Forschung sowie für Land- und Forstwirtschaft, vom Österreichischen Forstverein und der Fa. MLU-Umweltmeßtechnik finanziert.

Die Herren Prof. G. ÖQUIST (Umea, Schweden), Prof. N. R. BAKER (Colchester, U. K.), und Dr. U. SCHREIBER (Würzburg, BRD) stellten ihre Geräte im Rahmen des Workshop vor und lieferten alle für den Text nötigen Informationen.

#### Literatur

- BAKER N. R., EAST T. M. & LONG S. P. 1983. Chilling damage to photosynthesis in young *Zea mays*. – J. Exp. Bot. 139: 189–197.
- BAKER N. R. & HORTON P. 1988. Chlorophyll fluorescence quenching during photoinhibition. In: KYLE D. J. & OSMOND C. B. (eds.), Photoinhibition, pp. 145–168. – Elsevier Amsterdam.
- BOLHAR-NORDENKAMPF H. R. & LECHNER E. 1988 a. Temperature and light dependent modifications of chlorophyll fluorescence kinetics in spruce needles during winter. – Photosynth. Res. 18: 287–298.
- & – 1988 b. Winter stress and Chlorophyll fluorescence in Norway Spruce (*Picea abies* (L.) KARST.) In: LICHENTALER H. K. (ed.), Applications of Chlorophyll fluorescence, pp. 173–180. – Kluwer Academic Pub. Dordrecht.
- , LONG S. P., BAKER N. R., ÖQUIST G., SCHREIBER U. & LECHNER E. 1988. Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field. A review of current instrumentation. – Functional Ecology (in press).
- BONGH G. & LONG S. P. 1987. Light dependent damage of Photosynthesis in olive leaves during chilling and high light treatment. – Plant Cell Environ. 10: 241–249.
- BRIANTAIS J. M., VERNOTTE C., KRAUSE G. H. & WEISS E. 1986. Chlorophyll fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. In: GOVINDJEE, AMESZ J. & FORK D. C. (eds.), Light emission by plants and bacteria; pp. 539–577. – Academic Press New York.
- BUSCHMANN C. 1986. Fluoreszenz und Wärmeabstrahlung bei Pflanzen. – Naturwissenschaften 73: 691–699.
- BUTLER W. L. & KITAJIMA M. 1975. A tripartite model for chloroplast fluorescence. In: AVRON M. (ed.), Proceedings of the third International Congress on Photosynthesis, pp. 13–24. – Elsevier Amsterdam.



- DUYSENS L. N. M. & SWEERS H. E. 1963. Mechanism of two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In: ASHIDA J. (ed.), *Microalgae and photosynthetic bacteria*, pp. 353–372. – University of Tokyo Press Tokyo.
- HIPKINS M. F. & BAKER N. R. 1986. Spectroscopy. In: HIPKINS M. F. & BAKER N. R. (eds.), *Photosynthesis – energy transduction: A practical approach*, pp. 51–101: IRL Press Oxford.
- KAUTSKY H. & HIRSCH A. 1934. Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. Das Fluoreszenzverhalten grüner Pflanzen. – *Biochem. Z.* 27: 423–434.
- KECK R. W. & BOYER J. S. 1974. Chloroplast response to low leaf water potentials. III. Differing inhibition of electron transport and photophosphorylation. – *Plant Physiol.* 53: 474–479.
- KRAUSE G. H. & WEIS E. 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of the fluorescence signals. – *Photosynthesis Res.* 5: 139–157.
- LARCHER W. & CERNUSCA A. 1985. Mikrocomputergesteuerte, mobile Anlage zum fluorimetrischen Nachweis von Photosynthesestörungen. – *Ber. Österr. Akad. Wiss. (Wien)* 194: 45–64.
- LAVOREL J. & ETIENNE A. L. 1977. In vivo chlorophyll fluorescence. In: BARBER J. (ed.), *Primary processes of photosynthesis*, pp. 203–268. – Elsevier Amsterdam.
- ÖGREN E. & BAKER N. R. 1985. Evaluation of a technique for the measurement of chlorophyll fluorescence from leaves exposed to continuous white light. – *Plant Cell Environ.* 8: 539–547.
- ÖQUIST G. & WASS R. 1988. A portable, microprocessor operated instrument for measuring chlorophyll fluorescence kinetics in stress physiology. – *Physiol. Plantarum* 73: 211–217.
- PAPAGEORGIU G. 1975. Chlorophyll fluorescence. An intrinsic probe of photosynthesis. In: GOVINDJEE (ed.), *Bioenergetics of Photosynthesis*, pp. 320–360. – Academic Press New York.
- RENGER G. & SCHREIBER U. 1986. Practical applications of fluorimetric methods to algae and higher plant research. In: GOVINDJEE, AMESZ A. & FORK D. C. (eds.), *Light emission by plants and bacteria*, pp 587–619. – Academic Press New York.
- SCHREIBER U. & BILGER W. 1987. Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. In: CATARINO F. (ed.), *Plant response to stress* Springer Verlag Berlin, (in press)
- , SCHLIWA U. & BILGER W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorimeter. – *Photosynth. Res.* 10: 51–62.
- STRAND M & ÖQUIST G. 1985. Inhibition of photosynthesis by freezing temperatures and high light levels in cold-acclimated seedlings of Scots pine (*Pinus silvestris* L.) II. Effect on Chlorophyll fluorescence at room temperature and 77 k. – *Physiol. Plant.* 65: 117–123.
- & – 1988. Effects of frost hardening, dehardening and freezing stress on in vivo chlorophyll fluorescence of scots pine seedlings (*Pinus silvestris* L.). – *Plant Cell Environ.* 11: 231–238.
- WALKER D. A. 1987. The use of the oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. – Packard Publishing Ltd. Chichester, West Sussex, U. K.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn](#)

Jahr/Year: 1989

Band/Volume: [29\\_1](#)

Autor(en)/Author(s): Bolhàr-Nordenkamp Harald Romuald, Long S. P.,  
Lechner Elisabeth G.

Artikel/Article: [Die Bestimmung der Photosynthesekapazität über die Chlorophyllfluoreszenz als Maß für die Streßbelastung von Bäumen. 119-135](#)