# Stressvermeidung oder Toleranz: Anpassungsstrategien der Süßgräser Deschampsia cespitosa und Deschampsia wibeliana an periodische Überflutung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,

der Universität Hamburg

vorgelegt von

David Müller

aus Winsen (Luhe)

Hamburg, Juni 2014

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. D. HANELT Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. K. JENSEN Tag der Disputation: 22. August 2014

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1. Überflutungsstress bei Pflanzen	
1.2. Anpassungsstrategien an Überflutung	6
1.3. Anpassungen zur Verbesserung des Unterwasser-Gasaustauschs	10
1.4. Unterwasser-Photosynthese	11
1.5. Bedeutung der Alkoholdehydrogenase in überfluteten Pflanzen	13
1.6. Der <i>D. cespitosa</i> -Komplex	14
1.7. Zielsetzung	17
2. Material und Methoden	19
2.1. Untersuchte Taxa und eingesetztes Pflanzenmaterial	19
2.2. Durchgeführte Experimente und eingesetzte Versuchsanlagen	20
2.2.1. Erste Experimente zur physiologischen Reaktion auf Überflutung unter	
kontrollierten Bedingungen	20
2.2.2. Reziprokes Verpflanzungsexperiment im Freiland	24
2.2.3. Weiterführende Experimente zur Unterwasser-Photosynthese und dem	
Unterwasser-Gasaustausch	
2.3. Methoden	
2.3.1. Untersuchungen der Alkoholdehydrogenase in Blättern	33
2.3.2. Photosynthese-Effektivität	
2.3.3. Unterwasser-Photosynthese und -Dunkelatmung	41
2.3.4. Messung des Sauerstoffpartialdrucks im Wurzelaerenchym	43
2.3.5. Untersuchung der Blattmorphologie	47
2.3.6. Bestimmung der Deckung oberirdischer Biomasse	52

2.3.7. Quantifizierung von Pilzbefall	52
2.3.8. Statistik	53
3. Ergebnisse	54
3.1. Erste Experimente zur physiologischen Reaktion auf Überflutung unter	
kontrollierten Bedingungen	54
3.1.1. Alkoholdehydrogenase in Blättern	54
3.1.2. Photosynthese-Effektivität in Reaktion auf periodische Überflutung	58
3.2. Reziprokes Verpflanzungsexperiment im Freiland	59
3.2.1. Überflutungsregime und Temperatur in Kollmar	59
3.2.2. Entwicklung der reziprok verpflanzten Individuen im Freiland	60
3.2.3. ADH-Aktivität in Blättern reziprok verpflanzter Individuen	63
3.2.4. Photosynthese-Effektivität und Lichtsättigungseigenschaften beider Taxa	
nach reziproker Verpflanzung im Freiland	67
3.2.5. Untersuchung der Blattmorphologie nach reziproker Verpflanzung	75
3.2.6. Pilzbefall beider Taxa im Krempermoor	86
3.2.7. Deckung beider Taxa in Kollmar	87
3.3. Unterwasser-Photosynthese und Unterwasser-Gasaustausch	88
3.3.1. Klimakammerexperiment zur Untersuchung der Unterwasser-Photosynthe	se
und der morphologischen Akklimatisierung	88
3.3.2. Gewächshausexperiment zum Unterwasser-Gasaustausch	98
3.4. Übersicht der Ergebnisse	103
4. Diskussion	104
4.1. Erste Experimente zur physiologischen Reaktion auf Überflutung unter	
kontrollierten Bedingungen	104
4.1.1. Regulation der Alkoholdehydrogenase in Blättern	104
4.1.2. Stresszustand der Pflanzen in Reaktion auf periodische Überflutung	107
4.1.3. ADH-Induktion in den Blättern und Fv/Fm-Werte weisen auf eine	
Überflutungstoleranz beider Taxa hin	108

4.2. Reziprokes Verpflanzungsexperiment im Freiland	109
4.2.1. Entwicklung der reziprok verpflanzten Individuen im Freiland	110
4.2.2. Veränderung der Blattmorphologie in Anpassung an unterschiedliche Habitate	111
4.2.3. ADH-Aktivität in Blättern reziprok verpflanzter Individuen im Freiland	116
4.2.4. Regulation der Photosynthese in reziprok verpflanzten Individuen beider Taxa im Freiland	119
4.2.5. Schlussfolgerungen	123
4.3. Weiterführende Experimente zur Unterwasser-Photosynthese und dem Unterwasser-Gasaustausch	124
4.3.1. Auch im Laborversuch erhöht <i>D. cespitosa</i> die SLA in Reaktion auf periodische Überflutung	125
4.3.2. Akklimatisierung an periodische Überflutung führt zu einer signifikant höheren Unterwasser-Photosynthese bei <i>D. cespitosa</i>	126
4.3.3. Die Photosynthese-Effektivität weist auf leicht höheren Stress bei den Kontrollpflanzen hin	127
4.3.4. Verbesserte interne O <sub>2</sub> -Versorgung im Dunkeln durch Akklimatisierung an periodische Überflutung	130
4.4. Fazit	132
4.5. Ausblick	133
Literatur	135
Danksagungen	143
Anhang	145

# Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
air sat.	Luftsättigung, engl. air saturation
ALDH	Acetaldehyddehydrogenase
α	initiale Steigung der Lichtsättigungskurve
A <sub>max</sub>	Asymptote der Photosynthese bei Starklicht
$A_{qe}$	initiale Steigung der CO <sub>2</sub> -Lichtsättigungskurve
BSA	Rinderalbumin, engl. bovine serum albumin
DBL	diffusive Grenzschicht, engl. diffusive boundary layer
DIC	gelöster anorganischer Kohlenstoff, engl. dissolved inorganic carbon
DLC	Dark Leaf Clip
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
$E_k$	Lichtsättigungspunkt
ETR	Elektronentransportrate
ETR <sub>max</sub>	maximale Elektronentransportrate
F	Fluoreszenz an einem beliebigen Zeitpunkt
$F_m$	maximale Fluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand
F <sub>m</sub> '	maximale Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand
Fo	minimale Fluoreszenz im dunkeladaptierten Zustand
F <sub>o</sub> ʻ	minimale Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand
F <sub>t</sub>	aktuelle Fluoreszenz
$F_{v}$	variable Fluoreszenz
$F_v/F_m$	maximale Quantenausbeute des Photosystem II
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. horseradish peroxidase
LCP	Lichtkompensationspunkt, engl. light compensation point
LED	lichtemittierende Diode
LOES	low oxygen escape syndrome
LOQS	low oxygen quiescence syndrome
$\mathrm{NAD}^+$	oxidierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid

NPQ	nichtphotochemisches Quenching
NSC	nicht-strukturelle Kohlenhydrate, engl. nonstructural carbohydrates
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
PAR	photosynthetisch aktive Strahlung, engl. photosynthetically active radiation
PFA	Paraformaldehyd
$\Phi_{ m PSII}$	effektive Quantenausbeute des PS II (auch Y(II), $\Delta F/F_m$ ' oder $F_q'/F_m$ ')
$\Phi_{ m NPQ}$	reguliertes nichtphotochemisches Quenching
$\Phi_{ m NO}$	nicht reguliertes nichtphotochemisches Quenching
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PPF	photosynthetischer Photonenfluss
PPFD	photosynthetisch aktive Photonenflussdichte, engl. photosynthetically active photon flux density
PQ	Plastochinon, engl. plastoquinone
PS	Photosystem
QA	primärer Elektronenakzeptor des PS II
qL	Anteil "offener" PS II Reaktionszentren basierend auf einem "Lake-Modell" für die photosynthetischen Einheiten
qP	Koeffizient des photochemischen Quenchings basierend auf einem "Puddle- Modell" für die photosynthetischen Einheiten
RbcL	große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SLA	Spezifische Blattfläche, engl. specific leaf area (m <sup>2</sup> Blattfläche pro kg Trockenmasse)
SOD	Superoxiddismutase
SSC	Schwebstoffkonzentration, engl. suspended sediment concentration
TMZ	Turbidity Maximum Zone
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

### Zusammenfassung

Überflutung führt bei terrestrischen Pflanzen zu multiplem abiotischen Stress und beeinflusst dadurch auch die Verbreitung von Pflanzenarten. Bei vollständiger Überflutung stellt insbesondere die langsamere Gasdiffusion im Wasser die Pflanzen vor große Herausforderungen. Durch die etwa 10.000-mal langsamere Gasdiffusion kommt es bei Überflutung zu einem reduzierten Gasaustausch zwischen Blättern und Überflutungswasser, was wiederum zu Hypoxie im pflanzlichen Gewebe führt. Außerdem ist in überfluteten terrestrischen Pflanzen durch eine geringere Lichtintensität und eine erschwerte CO<sub>2</sub>-Aufnahme die Photosynthese und damit die Produktion lebenswichtiger Assimilate eingeschränkt. Terrestrische Pflanzen sind größtenteils nicht in der Lage, unter Wasser zu wachsen und sich zu reproduzieren, da ihnen Anpassungen aquatischer Pflanzen fehlen. Jedoch haben einige terrestrische Pflanzen Anpassungsstrategien entwickelt, die ihnen ein Überflutung und damit ein Vorkommen an Standorten mit regelmäßiger Überflutung ermöglichen.

*Deschampsia wibeliana* ist ein endemisches Taxon aus dem *Deschampsia cespitosa*-Komplex, das nur in den Tidemarschen des Elbe-Ästuars vorkommt. Dort hat sich *D. wibeliana* nach der letzten Eiszeit durch Anpassung an das durch periodische Überflutung gekennzeichnete Habitat von *D. cespitosa* differenziert. Die Mechanismen, die *D. wibeliana* ein Überleben und eine erfolgreiche Reproduktion am tidebeeinflussten Standort ermöglichen, sind jedoch unbekannt. Um diese Wissenslücke zu schließen, wurde die Aufdeckung dieser Anpassungsmechanismen in den Mittelpunkt der vorliegenden Studie gestellt.

Dazu wurden die Reaktionen auf periodische Überflutung zwischen *D. wibeliana* und *D. cespitosa* vergleichend untersucht, da *D. cespitosa* an Standorten ohne regelmäßige Überflutung vorkommt und somit wahrscheinlich nicht über die Anpassungsmechanismen von *D. wibeliana* verfügt. Bei den Untersuchungen standen physiologische Anpassungen auf Ebene des anaeroben Stoffwechsels und der Photosynthese sowie morphologische Anpassungen der Blätter, die den Unterwasser-Gasaustausch beeinflussen, im Fokus. Dabei wurden sowohl Experimente unter kontrollierten Bedingungen im Labor als auch ein reziprokes Verpflanzungsexperiment im Freiland durchgeführt.

Es wurde nachgewiesen, dass *D. wibeliana* keine Akklimatisierungsreaktion der Blattmorphologie zeigt. Die Blätter weisen jedoch generell eine hohe Gasfilmdicke auf, die für einen verbesserten Unterwasser-Gasaustausch sorgt. Außerdem wurde bei den periodisch überfluteten *D. wibeliana*-Pflanzen eine höhere ADH-Aktivität in den Blättern im Vergleich zu akklimatisierten *D. cespitosa*-Blättern nachgewiesen. Das weist auf eine echte Stresstoleranz gegenüber Überflutungsstress bei *D. wibeliana* hin und deutet somit auf eine "Quiescence"-Strategie in Reaktion auf Überflutung hin, die auf ein Überdauern der Überflutung ausgelegt ist und in der Literatur als vorteilhafte Anpassung an kurzzeitige Überflutungen beschrieben wird.

*D. cespitosa* zeigte dagegen eine starke Akklimatisierung in Reaktion auf periodische Überflutung mit der Entwicklung neuer "semi-aquatischer" Blätter mit einer höheren spezifischen Blattfläche. Außerdem wiesen die akklimatisierten Blätter eine höhere Unterwasser-Photosyntheserate und eine niedrigere ADH-Aktivität auf. Diese Merkmale weisen auf eine Stressvermeidungsstrategie hin, die in der Literatur als Anpassung an langfristige und tiefe Überflutungen beschrieben wird. Es gibt somit deutliche Hinweise auf spezifische Anpassungsmechanismen an Überflutung bei beiden Taxa, die sich jedoch bei unterschiedlichen Überflutungsregimen als vorteilhaft erweisen. Das könnte eine Erklärung für das distinkte Vorkommen dieser Taxa in unterschiedlichen Habitaten sein.

# 1. Einleitung

#### 1.1. Überflutungsstress bei Pflanzen

Überflutung ist einer der größeren abiotischen Einflussfaktoren auf terrestrische Pflanzen, der sowohl die Verbreitung von Pflanzenarten als auch die landwirtschaftliche Produktivität weltweit beeinflusst (Jackson et al., 2009). Eine teilweise oder vollständige Überflutung wirkt sich negativ auf das Wachstum der meisten terrestrischen Pflanzen aus und kann letztendlich zum Absterben der Pflanzen führen (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Im Zuge des Klimawandels werden häufigere Extremereignisse, wie Starkregen, vorhergesagt, was zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von Überflutungen, u. a. auch von Ackerflächen, führen würde (Arnell & Liu, 2001). Einige Arten überstehen diesen Überflutungsstress oder sind sogar in der Lage, während einer Überflutung deutlich zu wachsen (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Die meisten Nutzpflanzen sind hingegen nicht auf Überflutungstoleranz hin selektiert worden (u. a. Weizen, Gerste und Hafer; Setter & Waters, 2003) und daher intolerant gegenüber Überflutung (Voesenek & Sasidharan, 2013). Es ist somit eine große Herausforderung, die Mechanismen der Überflutungstoleranz in Pflanzen zu verstehen, sodass mit Hilfe dieses Wissens stresstolerante Nutzpflanzen entwickelt werden können (Voesenek & Sasidharan, 2013).

#### Auswirkungen von Überflutung auf terrestrische Pflanzen

Überflutung ist eine komplexe Stresssituation, die sich aus mehreren Komponenten zusammensetzt (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Voesenek & Sasidharan, 2013). Insbesondere die im Vergleich zur Luft etwa 10.000 mal langsamere Gasdiffusion im Wasser stellt überflutete Pflanzen vor große Herausforderungen (Colmer & Voesenek, 2009), da dies zu einem dramatisch reduzierten Gasaustausch zwischen Pflanzen und ihrer Umwelt führt (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Außerdem können in wassergesättigten Böden erhöhte Konzentrationen reduzierter und potentiell toxischer Substanzen auftreten, wenn Mikroorgansimen diese zuvor oxidierten Verbindungen oder Ionen als Elektronenakzeptoren nutzen (Laanbroek, 1990). Bei vollständiger Überflutung ist zudem die auf dem Blatt eintreffende Lichtintensität in Abhängigkeit von der Wassertrübung und der Überflutungstiefe reduziert (Vervuren et al., 2003; Das et al., 2009), was zusammen mit der geringen CO<sub>2</sub>-Verfügbarkeit die Photosynthese unter Wasser beeinträchtigt (Mommer & Visser, 2005).

#### Einleitung

Diese Veränderungen der abiotischen Umweltbedingungen verursachen Stress auf verschiedenen Ebenen. Colmer und Voesenek (2009) fassen diese Ebenen in fünf Kategorien zusammen: (i) Energiemangel, (ii) Kohlenhydratmangel, (iii) Toxizität, (iv) Wasserdefizit und (v) Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).

Die Sauerstoffabnahme während der Überflutung verläuft im Dunkeln und in nicht photosynthetisch aktiven Geweben schnell (Bailey-Serres & Voesenek, 2008) und führt zu einer Einschränkung der aeroben Energiegewinnung (Fukao & Bailey-Serres, 2004). Da jedoch der Großteil des für den Stoffwechsel benötigten ATP durch die oxidative Phosphorylierung in der Elektronentransportkette der aeroben Atmung gewonnen wird (Colmer & Voesenek, 2009), führt diese Einschränkung zu einer schnellen Abnahme der zellulären ATP-Konzentration (Gibbs & Greenway, 2003). Eine Umstellung des Stoffwechsels auf anaerobe Energiegewinnung über die Glykolyse und anschließende Fermentation ermöglicht zwar weiterhin eine ATP-Produktion (Mendelssohn et al., 1981; Ricard et al., 1994), diese ist jedoch wesentlich ineffektiver als die aerobe Energiegewinnung und führt somit langfristig zu einem Energiemangel (Gibbs & Greenway, 2003).

Durch die geringe Effektivität der anaeroben ATP-Produktion werden größere Mengen Glucose verbraucht und Stärke mobilisiert, um den Stoffwechsel aufrechtzuerhalten (Colmer & Voesenek, 2009). Ein Teil des fixierten Kohlenstoffs geht außerdem in Form von Ethanol, das in der alkoholischen Gärung produziert wird, ins Außenmedium verloren (Kennedy et al., 1992, Bailey-Serres et al., 2012). Hinzu kommt, dass die niedrigeren Photosyntheseraten unter Wasser zu einem verringerten Nachschub an Assimilaten führen (Colmer & Voesenek, 2009). Somit kommt es langfristig zu einer Erschöpfung der Kohlenhydratreserven und daraus resultierenden Zellschädigungen oder sogar dem Zelltod durch Energiemangel (Bailey-Serres & Voesenek, 2008).

Eine Überflutung des Bodens führt zu einer Reduktion und damit einhergehenden Toxizität zuvor oxidierter Substanzen im Boden (Blom & Voesenek, 1996). Das kann zur Akkumulation toxischer Konzentrationen von Ionen, wie  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  und  $S^{2-}$ , im Wurzelgewebe führen (Jackson & Drew, 1984). Auch Acetaldehyd, das Zwischenprodukt zwischen Pyruvat und Ethanol in der alkoholischen Gärung, kann toxische Konzentrationen erreichen, wenn es nicht schnell genug mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Ethanol oder durch die Acetaldehyddehydrogenase (ALDH) zu Acetat umgesetzt wird (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Wasserdefizite im Gewebe können insbesondere bei Staunässe im Boden auftreten. Zum einen können Schädigungen der Wurzeln zu einer verringerten Wasseraufnahme und einem Welken der Blätter führen (Colmer & Voesenek, 2009). Zum anderen konnten Tournaire-Roux et al. (2003) zeigen, dass eine durch Sauerstoffmangel bedingte Ansäuerung des Cytoplasmas in Wurzelzellen von *Arabidopsis* zu einer Abnahme der Permeabilität von Aquaporinen führt und somit die Wasseraufnahme reduziert.

Im pflanzlichen Stoffwechsel werden verschiedene ROS, wie Superoxid-Radikale, Hydroxyl-Radikale, Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff, kontinuierlich als Nebenprodukte der aeroben Atmung produziert (Apel & Hirt, 2004). Die Produktion von Superoxid-Radikalen in der mitochondrialen Elektronentransportkette findet bei niedrigen O2-Konzentrationen vermehrt statt. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit des finalen Elektronenakzeptors O<sub>2</sub> kommt es zu einem Elektronenstau am Komplex III (Cytochrom-bc<sub>1</sub>-Komplex) und einer Übertragung der Elektronen auf O<sub>2</sub> bereits am Komplex III, was zu einer Bildung von Superoxid-Radikalen führt (Colmer & Voesenek, 2009). Dadurch kommt es bei Hypoxie zu einer verstärkten Bildung von ROS und damit einhergehenden Zellschädigungen, wenn die antioxidative Abwehr nicht ausreicht. Dazu zählen Antioxidantien wie Ascorbinsäure, Glutathion und Tocopherole, Enzyme zur Regeneration der Antioxidantien und Enzyme, die direkt mit den ROS interagieren, wie Superoxiddismutase (SOD), Peroxidasen und Katalasen (Blokhina et al., 2003). Nach der Überflutung kommt es bei Re-Oxygenierung des Gewebes zu einem besonders starken Auftreten von ROS (Blokhina et al., 2003; Voesenek & Sasidharan, 2013). Daher stellt auch diese Phase der Überflutung eine große Herausforderung für die pflanzliche Überflutungstoleranz dar.

#### Stressrezeption bei Überflutung

ROS haben in pflanzlichem Gewebe nicht nur schädigende Wirkungen, sondern spielen auch eine wichtige Rolle bei der Rezeption von Stress (Blokhina et al., 2003; Apel & Hirt, 2004). Neben ROS nutzen überflutungstolerante Arten außerdem Veränderungen der O<sub>2</sub>-, CO<sub>2</sub>- und Ethylenkonzentration als Signale zur Induktion adaptiver Prozesse (Voesenek & Sasidharan, 2013). Die wichtigsten Signale für eine Regulation der Stressreaktion bei Überflutung stellen jedoch erhöhte Ethylen-Level und/oder sinkende O<sub>2</sub>-Konzentrationen dar (Voesenek & Sasidharan, 2013).

Ethylen ist als gasförmiges Hormon ebenfalls von der deutlich langsameren Gasdiffusion im Wasser betroffen. Dadurch führt die andauernde Produktion zu einem schnellen Anstieg der Ethylenkonzentration in überfluteten Pflanzen (Voesenek et al., 2006; Jackson, 2008). In

#### Einleitung

Wurzeln initiiert Ethylen die Bildung lysigenen Aerenchyms. Die schnelle Erhöhung der Ethylen-Level führt somit zu einer frühzeitigen Aerenchymbildung, bevor die Wurzeln Anoxie ausgesetzt sind (Voesenek & Sasidharan, 2013). Im Spross führen diese hohen Ethylen-Konzentrationen bei vielen terrestrischen Pflanzen zu einer Hemmung des Wachstums (Pierik et al., 2006). Bei einigen terrestrischen Arten initiiert Ethylen aber Reaktionen, die für eine Stressvermeidung durch Wiederherstellung des Luftkontakts und effektive pflanzeninterne Gasdiffusion sorgen. Dazu zählen die Ausbildung von Adventivwurzeln, Aerenchymbildung, die Aufrechtstellung der Blätter und verstärktes Streckungswachstum (Voesenek & Sasidharan, 2013).

Anpassungen auf Stoffwechselebene werden in erster Linie durch abnehmende  $O_2$ -Konzentrationen und Anoxie reguliert (Voesenek & Sasidharan, 2013). Von besonderer Bedeutung sind dabei die Absenkung des Sauerstoffverbrauchs bei niedrigen  $O_2$ -Konzentrationen (Geigenberger, 2003), eine Induktion der ethanolischen Gärung (Ricard et al., 1994) und eine Herunterregulation des Stoffwechsels bei bereits eingetretener Anoxie (Schlüter & Crawford, 2003). Hingegen werden die Ausbildung von Barrieren für den radiären Sauerstoffverlust (ROL, engl. radial oxygen loss) in den Wurzeln und Veränderungen der Blattmorphologie, die den Unterwasser-Gasaustausch beeinflussen, wahrscheinlich nicht durch Ethylen oder  $O_2$  reguliert (Voesenek & Sasidharan, 2013). Vermutlich sind für die Initiierung dieser Merkmale andere Bedingungen verantwortlich, die bei Überflutung auftreten, wie z. B. niedrige Lichtintensitäten, hohe Feuchtigkeit und erhöhte Konzentrationen toxischer Substanzen im Boden (Voesenek & Sasidharan, 2013).

#### 1.2. Anpassungsstrategien an Überflutung

Terrestrische Pflanzen sind größtenteils nicht in der Lage, unter Wasser zu wachsen und sich zu reproduzieren, wie es bei aquatischen Pflanzen der Fall ist, sondern müssen die Überflutungsperiode überstehen, um eine erfolgreiche Reproduktion nach Rückgang des Wassers zu ermöglichen (Mommer et al., 2006b). Aquatische Pflanzen weisen spezifische morphologische und physiologische Anpassungen auf. die hohe Unterwasser-Photosyntheseraten ermöglichen. Dazu zählen auf morphologischer Ebene eine geringe Blattdicke, eine dünnere oder fehlende Cuticula, stärker geteilte oder gefiederte Blätter und das Vorhandensein von Chloroplasten in der Epidermis (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Diese Merkmale reduzieren den Diffusionswiderstand oder verkürzen den Gasdiffusionsweg und führen so zu einem verbesserten Unterwasser-Gasaustausch (Sand-Jensen & Frost-Christensen, 1999). Außerdem ist eine Nutzung von HCO3<sup>-</sup> als Kohlenstoffquelle bei aquatischen Pflanzen weitverbreitet. Seltener sind C4- oder CAM-Photosynthese, die aber ebenfalls zu einer Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Bereich der RuBisCO führen (Colmer et al., 2011).

Aber auch einige terrestrische Pflanzen haben Anpassungsstrategien entwickelt, die ihnen ein Überleben der spezifischen Überflutungssituation in ihrem natürlichen Habitat ermöglicht (Voesenek & Sasidharan, 2013). Darunter ist eine Anpassung des Lebenszyklus an das Überflutungsregime weit verbreitet (Blom & Voesenek, 1996). *Chenopodium rubrum* vermeidet den Überflutungsstress vollständig, indem der gesamte Lebenszyklus in der kurzen Zeit zwischen zwei Überflutungsereignissen abgeschlossen wird und die produzierten Samen eine folgende Überflutung überdauern. Die zweijährige Art *Rumex palustris* ist hingegen in der Lage, eine Überflutungsphase im vegetativen Zustand zu überleben und die Blütenbildung und Samenproduktion ins folgende Jahr zu verlegen (Blom et al., 1994).

Eine Vermeidung der Überflutung durch Anpassung des Lebenszyklus ist aber nicht die einzige Strategie. Andere Arten weisen Strategien auf, die ihnen ein Überleben während der Überflutung ermöglichen (Voesenek & Sasidharan, 2013). Jedoch variieren Überflutungen an unterschiedlichen Standorten in ihrer Dauer, Tiefe und Frequenz (Vervuren et al., 2003), was zu einem multidimensionalen Kontinuum von Überflutungsregimen führt (Colmer & Voesenek, 2009). Das Überflutungsregime beeinflusst die gewebeinternen Konzentrationen von Ethylen, ROS, O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> (Voesenek & Sasidharan, 2013) und führt so zu einer Induktion spezifischer Reaktionen auf unterschiedliche Überflutungsbedingungen. Diese unterschiedlichen Überflutungsregime können aber im Hinblick auf die Anpassungsstrategien der überfluteten Pflanzen in vier Kategorien eingeteilt werden: (i) Staunässe im Boden (ohne Überflutung des Sprosses), (ii) vollständige Überflutung von kurzer Dauer, (iii) langfristige aber flache vollständige Überflutung und (iv) langfristige und tiefe vollständige Überflutung (Colmer & Voesenek, 2009).

Bei Staunässe ist es den Pflanzen noch möglich, O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> aus der Luft über die Blätter aufzunehmen und Photosynthese zu betreiben. Somit ist insbesondere die Weiterleitung des Sauerstoffs aus den oberirdischen Pflanzenteilen in die Wurzeln wichtig (Setter & Waters, 2003). Dies wird durch eine erhöhte Gewebeporosität, sogenanntes Aerenchym, erreicht, in dem eine schnelle Gasdiffusion möglich ist (Voesenek et al., 2006). Aerenchym wird in vielen toleranten Arten konstitutiv ausgebildet, kann aber auch in Reaktion auf Staunässe initiiert werden (Voesenek et al., 2006). Die Sauerstoffkonzentration in überfluteten Wurzeln nimmt aber nicht nur mit abnehmender Gewebeporosität ab, sondern auch mit zunehmender Distanz zur O<sub>2</sub>-Quelle (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Daher ist zusätzlich eine Suberinisierung der Wurzeln von Vorteil, um ROL zu minimieren und eine Weiterleitung des Sauerstoffs bis in die Wurzelspitze zu gewährleisten (Setter & Waters, 2003). Dort führt ROL dann außerdem zur Re-Oxygenierung der Rhizosphäre (Revsbech et al., 1999) und schützt die Wurzelspitze so vor Toxizität durch reduzierte Substanzen (Voesenek et al., 2006). Weiterhin sind bei Staunässe erhöhte Fermentationsraten zur Aufrechterhaltung der ATP-Gewinnung und eine Toleranz gegenüber der Re-Oxygenierung wichtig (Setter & Waters, 2003).

Bei Überflutung des Sprosses sind die genannten Anpassungen an Staunässe ebenfalls von Bedeutung, da der Boden auch bei einer vollständigen Überflutung wassergesättigt ist. Die Symptome im Wurzelbereich können durch eine Überflutung des Sprosses sogar noch verstärkt werden, da auch der Gasaustausch in den Blättern deutlich eingeschränkt ist und so der Sauerstofftransport in die Wurzeln weiter reduziert wird (Colmer & Voesenek, 2009). Anpassungen im Sprossbereich sind abhängig von Dauer und Tiefe der Überflutung. In Anpassung an kurze Überflutungen haben Pflanzenarten eine sogenannte "Quiescence-" oder "Ruhe-Strategie" entwickelt, bei der der Energieverbrauch minimiert wird, um so das Überleben der Überflutungsphase zu sichern und bei einem Rückgang des Wassers schnell zu einer hohen Wachstumsrate zurückzukehren (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Colmer & Voesenek, 2009). Diese Strategie wird auch als "Low Oxygen Quiescence Syndrome" (LOQS) bezeichnet (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Dem gegenüber steht das sogenannte "Low Oxygen Escape Syndrome" (LOES), das in Habitaten mit länger andauernden aber relativ flachen Überflutungen von Vorteil ist (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Bei dieser Strategie ermöglicht ein schnelles Streckungswachstum des Sprosses und/oder eine Aufrechtstellung der Blätter die Wiederherstellung des Luftkontakts und damit einen deutlich verbesserten Gasaustausch (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Colmer & Voesenek, 2009).

Interessanterweise werden diese gegensätzlichen Strategien bei Reis (*Oryza sativa*) über ein einzelnes Gen des polygenen Locus *Submergence1* (*Sub1*) gesteuert (Fukao et al., 2006; Xu et al., 2006; Perata & Voesenek, 2007). *Sub1A* enthält eine Ethylen-sensitive Domäne und kodiert für einen Transkriptionsfaktor. Bei Überflutung wird dieses Gen durch die Anreicherung von Ethylen im Gewebe induziert, was zu einer Synthese des Transkriptionsfaktors SUB1A führt. SUB1A induziert wiederum Gene, die für die alkoholische Gärung wichtig sind (*Pdc2*, *Pdc4*, *Adh1* und *Adh2*) und sorgt gleichzeitig für die Repression von Genen, die beim Streckungswachstum (*Expansin A*) und dem Kohlenhydratabbau (*Sus3*) eine Rolle spielen (Fukao et al., 2006). *Sub1A* induziert somit bei

8

Überflutung eine "Quiescence"-Strategie und sorgt für eine Toleranz der Überflutung. Fehlt das *Sub1A*-Gen oder ist ein nur leicht verändertes Allel vorhanden, ist die Überflutungstoleranz reduziert und es wird stattdessen die LOES-Strategie induziert, um dem Überflutungsstress zu entgehen (Bailey-Serres & Voesenek, 2008).

Die "Quiescence"-Strategie führt zu einer "echten" Toleranz gegen Überflutung, während die LOES-Strategie eine Stressvermeidung initiiert (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). LOES führt zu einer Wiederherstellung des Luftkontakts und kann dadurch sogar in den Wurzeln zu einer Verhinderung von Hypoxie führen. Dazu ist jedoch ein effektiver Gastransport aus den Blättern mit Luftkontakt in die Wurzeln nötig, was durch eine hohe Gewebeporosität erreicht wird (Herzog & Pedersen, 2014). Nur bei Arten mit einer ausreichend hohen Porosität des Sprosses bzw. der Blattstiele konnte ein signifikanter Effekt des Luftkontakts einiger Blätter auf die O<sub>2</sub>-Konzentration der überfluteten Pflanzenorgane nachgewiesen werden (Rich et al., 2013; Herzog & Pedersen, 2014). Bei der "Quiescence"-Strategie hingegen werden niedrige Sauerstoffkonzentrationen im Pflanzengewebe nicht verhindert, sondern können durch eine erhöhte Kapazität zur fermentativen Energiegewinnung (Fukao et al., 2006) und einen reduzierten Stoffwechsel (Schlüter & Crawford, 2003; van Veen et al., 2013) toleriert werden.

Bei Anpassung an langfristige und tiefe Überflutungen spielen sowohl Merkmale der LOES- als auch der "Quiescence"-Strategie eine Rolle (Colmer & Voesenek, 2009). Der hohe energetische Aufwand, der mit der LOES-Strategie verbunden ist, sorgt dafür, dass sich diese Reaktion bei großen Überflutungshöhen als nachteilig erweist (Voesenek et al., 2004). Daher wird zur Erhöhung der internen Sauerstoffkonzentration kein verstärktes Streckungswachstum initiiert, sondern es findet eine Akklimatisierungsreaktion der Blätter statt (Colmer & Voesenek, 2009). Diese neuen, unter Wasser gebildeten Blätter wurden in Anlehnung an die Blätter aquatischer Gefäßpflanzen auch als "aquatische" oder "semi-aquatische" Blätter bezeichnet (Mommer et al., 2005b; Winkel et al., 2013). Im Vergleich zu den an der Luft gebildeten "terrestrischen" Blättern weisen "aquatische" Blätter eine höhere spezifische Blattfläche (SLA) und eine dünnere epidermale Zellwand und Cuticula auf (Mommer et al., 2005b, 2007). Diese Akklimatisierung führt zu einer Erhöhung der internen O<sub>2</sub>-Konzentration und somit zu einer Stressvermeidung (Mommer et al., 2004, 2007). Jedoch hängt die interne O2-Versorgung aufgrund des fehlenden Luftkontakts stark von den im Tagesverlauf schwankenden O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen des Überflutungswassers ab (Winkel et al., 2013). So können insbesondere bei hohen Temperaturen und gleichzeitiger Überflutung im Dunkeln anoxische Verhältnisse im Gewebe erreicht werden (Gleason & Zieman, 1981).

Somit ist auch weiterhin eine Toleranz gegenüber niedrigen O<sub>2</sub>-Konzentrationen durch erhöhte fermentative Kapazität und ROS-Abwehr notwendig, um die langfristigen und tiefen Überflutungen zu überleben (Colmer & Voesenek, 2009).

# 1.3. Anpassungen zur Verbesserung des Unterwasser-Gasaustauschs

Aquatische Pflanzenarten weisen morphologische und anatomische Blattmerkmale auf, die den Gasdiffusionswiderstand verringern und so den Unterwasser-Gasaustausch verbessern (Colmer et al., 2011). Aber auch terrestrische Arten können über Anpassungen zur Verbesserung des Gasaustauschs verfügen. Einige Arten produzieren als Reaktion auf Überflutung neue Blätter mit einer dünneren Cuticula und einer höheren SLA, während andere Arten durch hydrophobe Blattoberflächen unter Wasser einen Gasfilm auf den Blättern ausbilden. Beides führt zu einem verbesserten Unterwasser-Gasaustausch (Colmer et al., 2011).

Die höhere SLA und die dünnere epidermale Zellwand und Cuticula akklimatisierter "aquatischer" Blätter führt zu einer Verbesserung des diffusiven Gasaustauschs über die Epidermis (Mommer et al., 2005a). Dabei sorgt die höhere SLA für eine Erhöhung der relativen Oberfläche pro Biomasseeinheit, über die ein Gasaustausch stattfinden kann (Mommer et al., 2005a), während die dünnere Cuticula den Gasdiffusionswiderstand zwischen Blatt und Überflutungswasser reduziert (Frost-Christensen et al., 2003; Mommer et al., 2004). Da eine Akklimatisierungsreaktion in Bezug auf die Blattmorphologie aber sowohl bei überflutungstoleranten Arten als auch bei nicht toleranten Arten nachgewiesen werden konnte, stellt diese Reaktion eher eine Grundvoraussetzung für das Überleben von langfristigen Überflutungsereignissen dar (Mommer et al., 2007). Es sind jedoch weitere Anpassungen nötig, um das Überleben während der Überflutung zu ermöglichen. Wahrscheinlich spielt die interne Gasweiterleitung eine wichtige Rolle für die Überflutungstoleranz, da ein verbesserter Gasaustausch in den Blättern nur zu einer Erhöhung der internen O<sub>2</sub>-Konzentration in nicht photosynthetisch aktiven Geweben führt, wenn eine ausreichende Gasweiterleitung gewährleistet ist (Voesenek et al., 2006). Darauf weisen auch die Ergebnisse von Mommer et al. (2006a, 2007) hin, die nachweisen konnten, dass überflutungstolerante Arten tendenziell eine höhere Porosität der Blattstiele aufweisen.

Im Gegensatz zum diffusiven Gasaustausch über die Epidermis ermöglichen Gasfilme auf der Blattoberfläche einen stomatären Gasaustausch unter Wasser (Verboven et al., 2014).

Dadurch führen Gasfilme zu einem deutlich schnelleren Gasaustausch im Vergleich zur Diffusion, da die Aufnahme weniger stark durch die langsame Diffusion von Gasen in Wasser eingeschränkt wird und auch der Diffusionswiderstand der Cuticula umgangen wird (Colmer & Pedersen, 2008b; Verboven et al., 2014). Bei vorhandenem Gasfilm stellt die Dicke der diffusiven Grenzschicht (DBL, engl. diffusive boundary layer) den größten Widerstand des Gasaustauschs zwischen dem Gasfilm und dem Überflutungswasser dar, da die Gase die DBL durch Diffusion überwinden müssen (Verboven et al., 2014). Die Dicke der DBL wird wiederum durch die Strömungsgeschwindigkeit des Wassers bestimmt und nimmt mit zunehmender Strömungsgeschwindigkeit ab (Gundersen & Jørgensen, 1990). Ein verbesserter Unterwasser-Gasaustausch ist ein wichtiger Faktor für das Überleben überfluteter terrestrischer Pflanzen (Raskin & Kende, 1983; Mommer et al., 2005a), da nicht nur eine direkte Aufnahme von O<sub>2</sub> aus dem Überflutungswasser, insbesondere nachts, die interne O<sub>2</sub>-Konzentration erhöht, sondern tagsüber eine verbesserte Aufnahme von CO2 durch eine erhöhte Photosyntheserate indirekt ebenfalls einer Erhöhung der zu internen Sauerstoffkonzentration führt (Mommer et al., 2004; Colmer & Pedersen, 2008b; Winkel et al., 2013).

#### 1.4. Unterwasser-Photosynthese

Bei vollständiger Überflutung ist Unterwasser-Photosynthese ein bedeutender Faktor für das Überleben terrestrischer Pflanzen (Mommer & Visser, 2005), da O<sub>2</sub> und Kohlenhydrate für die aerobe Atmung produziert werden (Colmer et al., 2011). Im Vergleich zu aquatischen Pflanzen sind die Unterwasser-Photosyntheseraten bei terrestrischen Pflanzen deutlich niedriger (Mommer et al., 2006b), dennoch sind die Effekte auf die Überlebensrate beträchtlich (Mommer et al., 2006b; Colmer et al., 2014). Bereits geringe Lichtintensitäten erhöhen die Überlebensrate überfluteter terrestrischer Pflanzen (Mommer & Visser, 2005).

Die Unterwasser-Photosynthese wird durch einen verbesserten Unterwasser-Gasaustausch positiv beeinflusst und erhöht die internen O<sub>2</sub>-Konzentrationen (Winkel et al., 2014). Insbesondere das Vorhandensein eines Gasfilms auf der Blattoberfläche erhöht die Unterwasser-Photosyntheserate (Colmer & Pedersen, 2008b; Winkel et al., 2011; Winkel et al., 2014). Eine erhöhte Unterwasser-Photosyntheserate führt zu einer erhöhten Sauerstoffkonzentration, nicht nur in den photosynthetisch aktiven Geweben (Mommer et al., 2006b; Colmer et al., 2014; Herzog & Pedersen, 2014), sondern auch in den Wurzeln, sofern eine effektive interne Gasdiffusion gewährleistet ist (Colmer & Pedersen, 2008a; Pedersen et al., 2009; Herzog & Pedersen, 2014). Reispflanzen sind sogar während der Überflutung in der

Lage, Sauerstoff über die Wurzeln ins Sediment abzugeben und so der Reduktion toxischer Substanzen im Wurzelraum entgegenzuwirken (Revsbech et al., 1999).

Negative Einflüsse auf die Unterwasser-Photosyntheserate gehen vor allem von einem hohen Trübungsgrad, einem hohen pH und einer niedrigen CO<sub>2</sub>-Konzentration des Überflutungswassers aus (Frost-Christensen & Sand-Jensen, 1995). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass auch in der Atmungskette freigesetztes CO<sub>2</sub> im Calvin-Zyklus der Photosynthese wiederverwertet wird (Mustroph et al., 2006). Zusätzlich kann es bei Anoxie während der Überflutung zu einer Schädigung des Photosyntheseapparats kommen (Schlüter & Crawford, 2003), was sich auch negativ auf die Photosyntheserate nach Rückkehr zur Normoxie auswirkt (Mustroph et al., 2006).

Aufgrund ähnlicher Merkmalsausprägungen bei "aquatischen" Blättern und Schattenblättern wurde in einigen Studien diskutiert, dass eine Akklimatisierung der Blätter an Überflutung eigentlich eine Anpassung an niedrige Lichtintensitäten sei (Frost-Christensen & Sand-Jensen, 1995; Wells & Pigliucci, 2000; Boeger & Poulson, 2003). Sowohl morphologische (SLA, Länge des Blattstiels) als auch biochemische Veränderungen (Chlorophyll, Unterwasser-Lichtkompensationspunkt) in Reaktion auf niedrige Lichtintensitäten und Überflutung verlaufen in die gleiche Richtung, können aber in ihrem Ausmaß um den Faktor zehn variieren (Mommer et al., 2005a). Mommer et al. (2005a) konnten aber zeigen, dass die maximale Unterwasser-Photosyntheserate bei sättigender Lichtintensität trotzdem in überflutungsakklimatisierten Blättern deutlich höher ist als in schattenakklimatisierten Blättern. Das deutet darauf hin, dass für die Unterwasser-Photosynthese Anpassungen zur Verbesserung des Gasaustauschs wichtiger sind als die Optimierung der Lichtabsorption (Mommer et al., 2005a). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Lichtintensität unter Wasser keinen Einfluss auf die SLA hat, was zeigt, dass die Akklimatisierung unter Wasser nicht durch die Lichtquantität, sondern durch andere Faktoren, wie z. B. geringe Assimilatkonzentrationen, reguliert werden (Mommer et al., 2005a).

#### 1.5. Bedeutung der Alkoholdehydrogenase in überfluteten Pflanzen

ADH ist ein Schlüsselenzym der alkoholischen Gärung. Es katalysiert dabei sowohl die Reaktion von Acetaldehyd zu Ethanol unter Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> als auch die Rückreaktion. Daneben spielt ADH aber auch eine wichtige Rolle bei der Pufferung des sogenannten "PDH-bypass", bei dem Kohlenstoff aus Pyruvat über Acetaldehyd und Acetyl-CoA in den Tricarbonsäurezyklus und die Fettsäure- und Aminosäurebiosynthese geschleust wird. Außerdem ist ADH an der Synthese von Duftstoffen in Blüten durch die Umwandlung von Aldehyden in Alkohole beteiligt (Strommer, 2011).

Bei Überflutung spielt die Fermentation eine wichtige Rolle, wenn eine Stressvermeidung nicht möglich ist und die Sauerstoffkonzentrationen im Gewebe absinken (Ricard et al., 1994; Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Unter natürlichen Bedingungen können drei Phasen des anoxischen Stresses unterschieden werden: transiente Hypoxie, Anoxie und die Re-Oxygenierungsphase (Blokhina et al., 2003). Als Hypoxie werden Zustände mit Sauerstoffkonzentrationen unterhalb des Luftequilibriums (20,9 %) aber oberhalb von 0 % O<sub>2</sub> bezeichnet. Bei vollständiger Abwesenheit von Sauerstoff (0 %) spricht man von Anoxie (Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Insbesondere bei Hypoxie und Anoxie sind erhöhte Kapazitäten zur fermentativen Energiegewinnung wichtig. Der wichtigste Stoffwechselweg, der in allen pflanzlichen Geweben bei limitierenden O2-Konzentrationen induziert wird, ist die alkoholische Gärung (Ricard et al., 1994). Da die aerobe Energiegewinnung durch die geringe Verfügbarkeit des finalen Elektronenakzeptors O<sub>2</sub> in der mitochondrialen Elektronentransportkette eingeschränkt ist, wird verstärkt Energie über die Glykolyse gewonnen (Gibbs & Greenway, 2003). Jedoch wird das produzierte NADH nicht mehr in der mitochondrialen Elektronentransportkette zu NAD<sup>+</sup> regeneriert, was zu einem Stillstand der Glykolyse führen würde. Die ethanolische Fermentation verhindert diesen Stillstand der ATP-Produktion durch Regeneration des NAD<sup>+</sup> bei der Reaktion von Acetaldehyd zu Ethanol, die durch ADH katalysiert wird (Strommer, 2011).

Anoxie führt zu einer schnellen Inhibierung der Proteinsynthese (Bailey-Serres & Freeling, 1990), mit Ausnahme von etwa 20 sogenannten ANPs ("anaerobic proteins"), die weiterhin synthetisiert werden (Ricard et al., 1994; Sachs et al., 1996). Die meisten dieser ANPs, die ursprünglich in Maiswurzeln identifiziert wurden, sind Enzyme der Glykolyse und Fermentation (Ricard et al., 1994; Sachs et al., 1996). Zwar wurden in Soja (*Glycine max*) nur vier unter Anoxie weiter synthetisierte Proteine gefunden, aber auch unter diesen vier Proteinen ist ADH vertreten (Russell et al., 1990). Das verdeutlicht die Bedeutung der

Glykolyse und alkoholischen Gärung bei Sauerstoffmangel. Allerdings korreliert eine erhöhte Aktivität der Glykolyse und Fermentation nicht direkt mit der Überlebensdauer bei niedrigen O<sub>2</sub>-Konzentrationen (Drew, 1997; Gibbs & Greenway, 2003). Somit stellt diese Reaktion eher eine Grundvoraussetzung für die Hypoxie-Toleranz dar (Bailey-Serres & Voesenek, 2008).

Die meisten Untersuchungen zur Regulation der ADH wurden in Wurzeln durchgeführt (z. B. Crawford, 1966; Mendelssohn et al., 1981; Andrews et al., 1993; Benz et al., 2007). Jedoch konnten auch in oberirdischen Pflanzenteilen erhöhte ADH-Aktivitäten in Reaktion auf Überflutung nachgewiesen werden. Hier zeigte sich außerdem eine differenzielle Reaktion zwischen überflutungstoleranten und nicht toleranten Arten, da nur tolerante Arten eine Erhöhung der ADH-Aktivität im Spross aufwiesen (Xie & Wu, 1989; Kennedy et al., 1992; Kato-Noguchi, 1999).

#### 1.6. Der D. cespitosa-Komplex

Die Gattung *Deschampsia* P. Beauv. aus der Familie der Süßgräser (Poaceae) umfasst weltweit etwa 40 Arten annueller und mehrjähriger Gräser (Mabberley, 1987). *Deschampsia cespitosa* (L.) P. Beauv. s. str. ist hauptsächlich in der nördlichen Hemisphäre mit einer fast vollständig circumpolaren Verbreitung vertreten (Hultén, 1962). Der *D. cespitosa*-Komplex besteht aus etwa 40 Taxa, deren Verwandtschaftsgrade nicht abschließend geklärt sind, da es eine große morphologische Variabilität gibt und die Grenzen zwischen den Taxa unklar sind (Chiapella, 2000; Chiapella & Probatova, 2003; Chiapella et al., 2011). Trotz distinkter geographischer Verbreitungen der mittel- und nordeuropäischen Taxa *D. alpina* (L.) Roem. et Schult., *D. bottnica* (Wahlenb.) Trin., *D. littoralis* (Gaudin) Reuter und *D. wibeliana* (Sond.) Parl. konnte Chiapella (2000) deutliche Überschneidungen morphologischer und genetischer Parameter nachweisen und empfiehlt daher die Einstufung dieser Taxa als Subspezies von *D. cespitosa*.

Nach der letzten Eiszeit in Europa breitete sich *D. cespitosa* in nördlicher Richtung in Gebiete aus, die zuvor von Gletschern bedeckt waren. An Nord- und Ostsee differenzierten sich die Taxa *D. wibeliana* und *D. bottnica* durch Anpassung an Habitate, die durch Überflutung gekennzeichnet sind (Scholz, 2007). Eine Artbildung durch differentielle Selektion zwischen zwei Populationen aufgrund unterschiedlicher Umweltbedingungen am jeweiligen Standort wird auch als ökologische Artbildung bezeichnet (Rundle & Nosil, 2005). Dabei kommt es letztendlich durch Adaptationen zu einer reproduktiven Isolierung der Populationen. Im Hinblick auf die räumliche Trennung der Populationen können sowohl

#### Einleitung

allopatrische als auch sympatrische Bedingungen zu einer solchen Auftrennung führen. Es ist aber auch möglich, dass eine allopatrische Phase zu einer ersten divergenten Entwicklung führt und es dann zu einem weiteren sekundären Genfluss zwischen den Populationen kommt, woraufhin die reproduktive Isolierung in einer anschließenden sympatrischen Phase abgeschlossen wird (Rundle & Nosil, 2005).

Bei der Anpassung an unterschiedliche Umweltbedingungen kann eine kurzfristige langfristigen Akklimatisierung von einer Adaptation unterschieden werden. Akklimatisierungen sind kurzfristige Reaktionen auf veränderte äußere Bedingungen, z. B. in Form von Veränderungen der Genexpression und Proteinsynthese, während Adaptationen langfristige Veränderungen auf genetischer Ebene sind, die durch natürliche Selektion vorangetrieben werden (Eberhard et al., 2008). Bei der zeitlich gesehen ersten Phase der Anpassung, der Akklimatisierung, spielt die phänotypische Plastizität eine wichtige Rolle (Wells & Pigliucci, 2000). Da die phänotypische Plastizität eines Individuums genetisch kontrolliert wird, kann sie auch eine Rolle bei der Evolution einer Art spielen (Wetson et al., 2012). Durch die hohe Variabilität phänotypischer Reaktionen können unterschiedliche Akklimatisierungsreaktionen letztendlich zu einer räumlichen Isolierung in unterschiedlichen Habitaten und damit zu einer divergierenden evolutiven Entwicklung führen (Benz et al., 2007).

#### Deschampsia cespitosa und D. wibeliana

Die untersuchten Taxa *D. cespitosa* und *D. wibeliana* unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Verbreitung und des hydrologischen Regimes der Habitate (Abbildung 1). *D. wibeliana* ist ein endemisches Taxon am Unterlauf der Elbe zwischen Hamburg und der Elbmündung (Schmeil et al., 2006), wo die Pflanzen tidebedingter Überflutung ausgesetzt sind. Dagegen ist *D. cespitosa* weit verbreitet an feuchten, quelligen Standorten, wie Flachmooren und Feuchtwiesen (Schmeil et al., 2006) und ist somit eher Staunässe als vollständiger Überflutung ausgesetzt.



Abbildung 1: Verbreitung in Norddeutschland und äußeres Erscheinungsbild der untersuchten Taxa. Rote Punkte: aktuelle Belege (nach 1950), schwarze Punkte: ehemalige Belege (nur vor 1950); A: Verbreitung von *Deschampsia cespitosa*, B: Verbreitung von *Deschampsia wibeliana*, C: *D. cespitosa*, D: *D. wibeliana* (A & B: verändert nach www.floraweb.de).

#### Einleitung

In früheren Untersuchungen von Heydel (2008) zu diesen beiden Taxa konnten Hinweise auf eine genetische Differenzierung der Taxa gefunden werden. Außerdem wurden Unterschiede im Blühzeitpunkt nachgewiesen, was einen möglichen Mechanismus für eine reproduktive Isolation darstellt. Es wurden zudem Hinweise auf die Bedeutung der periodischen Überflutung als Selektionsfaktor im *D. wibeliana*-Habitat gefunden. In einem fünfmonatigen Überflutungsexperiment in einer Überflutungsanlage im Freien wurde eine deutlich reduzierte Biomasse bei *D. cespitosa* in Reaktion auf periodische Überflutung von zweimal täglich 5,6 h nachgewiesen, während *D. wibeliana* im Gegensatz dazu die geringste Biomasse in der Variante ohne Überflutung aufwies. Diese differentielle Reaktion auf periodische Überflutung sollte in der vorliegenden Studie näher untersucht werden, um mögliche Mechanismen der höheren Toleranz gegenüber periodischer Überflutung bei *D. wibeliana* aufzudecken.

Die Taxa des *D. cespitosa*-Komplexes stellen ein geeignetes Modell für die Untersuchung von Artbildungsprozessen lokalendemischer Taxa hydrologischer Sonderstandorte dar (Heydel, 2008). Zusätzlich bietet die differentielle Reaktion auf Überflutung bei *D. cespitosa* und *D. wibeliana* aber auch die Möglichkeit, Anpassungsmechanismen an Überflutung zu untersuchen. In Hinblick auf die Entwicklung neuer überflutungstoleranter Nutzpflanzen ist es besonders wichtig, Anpassungen in nicht domestizierten Arten zu untersuchen, da dies eine Quelle neuer, bisher unbekannter Toleranzmechanismen darstellt (van Veen et al., 2013).

#### 1.7. Zielsetzung

Heydel (2008) konnte zeigen, dass *D. cespitosa* und *D. wibeliana* eine differentielle Reaktion auf periodische Überflutung zeigen. *D. wibeliana* wies in Reaktion auf periodische Überflutung eine höhere Biomasseproduktion auf als in einer nicht überfluteten Variante. Im Gegensatz dazu war die Biomasseproduktion bei *D. cespitosa* in der periodisch überfluteten Variante deutlich reduziert. Die Mechanismen, die *D. wibeliana* eine höhere Biomasseproduktion bei periodischer Überflutung ermöglichen, sind jedoch unbekannt. Diese zugrundeliegenden Mechanismen sollten im Rahmen dieser Studie untersucht werden. Dabei wurde der Schwerpunkt auf physiologische und morphologische Anpassungsmechanismen gelegt, während in einer parallel laufenden Untersuchung von Ambroselli (2013) der Schwerpunkt auf physiologischen und molekularen Mechanismen lag. Die übergeordneten Hypothesen dieser Untersuchungen lauten:

- I. D. wibeliana weist Toleranzmechanismen gegenüber periodischer Überflutung auf.
- II. D. cespitosa fehlen diese Toleranzmechanismen.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen wurden sowohl Experimente unter kontrollierten Bedingungen im Labor als auch ein Freilandexperiment durchgeführt. In einem Laborexperiment zur Regulation der ADH in den Blättern beider Taxa in Reaktion auf periodische Überflutung sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- 1. Regulieren beide Taxa in Reaktion auf periodische Überflutung die ADH in den Blättern herauf?
- 2. Gibt es Unterschiede zwischen den Taxa bezüglich der ADH-Regulation in den Blättern?

Außerdem sollte der Stresszustand der Pflanzen durch Bestimmung des  $F_v/F_m$ -Werts untersucht werden, um folgende Fragestellung zu beantworten:

3. Ist D. wibeliana durch periodische Überflutung weniger gestresst als D. cespitosa?

In einem reziproken Verpflanzungsexperiment im Freiland wurde neben der ADH in den Blättern und der Stressreaktion auch die Blattmorphologie untersucht. Dabei sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- 4. Sind beide Taxa in der Lage, im Habitat des jeweils anderen Taxons zu überleben?
- 5. Sind Akklimatisierungsreaktionen in Bezug auf die Blattmorphologie nach Verpflanzung ins fremde Habitat nachweisbar?
- 6. Weist D. wibeliana spezifische Anpassungen der Blattmorphologie auf?
- 7. Gibt es qualitative oder quantitative Unterschiede in der Reaktion auf periodische Überflutung zwischen Labor- und Freilandexperimenten?

In weiterführenden Experimenten im Labor sollten die Auswirkungen der Akklimatisierung beider Taxa an periodische Überflutung auf den Unterwasser-Gasaustausch und die Unterwasser-Photosynthese untersucht werden. Dabei standen folgende Fragestellungen im Mittelpunkt:

- 8. Führt eine Akklimatisierung an periodische Überflutung in einem der Taxa zu einem erhöhten pflanzeninternen Sauerstoffpartialdruck unter Wasser?
- 9. Weist *D. wibeliana* eine höhere Unterwasser-Photosynthese bei nichtsättigender CO<sub>2</sub>-Konzentration auf?

# 2. Material und Methoden

## 2.1. Untersuchte Taxa und eingesetztes Pflanzenmaterial

Von den untersuchten Taxa *Deschampsia cespitosa* (L.) P. Beauv. s. str. und *Deschampsia wibeliana* (Sond.) Parl. wurden jeweils Individuen zweier Populationen von natürlichen Vorkommen in Schleswig Holstein entnommen. Die Populationen von *D. cespitosa* befinden sich im Liether Moor (53°43'29.36"N/9°41'27.92"E; A in Abbildung 2) und im Krempermoor (53°43'29.36"N/9°41'27.92"E; B in Abbildung 2). Beide Standorte liegen in etwa 10 km Entfernung zum Elbufer. Die *D. wibeliana*-Populationen befinden sich im tidebeeinflussten Bereich zweier Brack- bzw. Süßwassermarschen der Elbe in der Nähe der Orte Kollmar (53°43'46.11"N/9°28'14.31"E; C in Abbildung 2) und Brokdorf (53°50'9.77"N/9°21'48.36"E; D in Abbildung 2).



Abbildung 2: Standorte an denen Individuen entnommen wurden. *D. cespitosa*: A "Liether Moor", B "Krempermoor"; *D. wibeliana*: C "Kollmar", D "Brokdorf".

### 2.2. Durchgeführte Experimente und eingesetzte Versuchsanlagen

# 2.2.1. Erste Experimente zur physiologischen Reaktion auf Überflutung unter kontrollierten Bedingungen

Mögliche Unterschiede in der physiologischen Reaktion auf Überflutung beider Taxa sollten zunächst unter kontrollierten Bedingungen untersucht werden, da weder für *D. cespitosa* noch für *D. wibeliana* physiologische Reaktionen auf Überflutung bekannt waren. Dazu wurde eine Überflutungsanlage aus Kunststofftonnen spezialangefertigt und in einer Klimakammer betrieben (siehe unten: Abschnitt "Überflutungsanlage: Kunststofftonnensystem"). So war es möglich, ausschließlich den Faktor der Überflutung zu manipulieren und physiologische Reaktionen beider Taxa auf periodische Überflutung zu untersuchen.

Es wurde angenommen, dass eine periodische vollständige Überflutung der Pflanzen insbesondere Anpassungen der oberirdischen Pflanzenteile bedingt. Die Unterscheidung zwischen den Habitaten beider Taxa bezüglich der Sauerstoffverfügbarkeit liegt wahrscheinlich weniger im Wurzelbereich, da beide Habitate sehr feuchte Böden aufweisen. Vielmehr schränkt die tidebedingte periodische Überflutung der Pflanzen im *D. wibeliana*-Habitat die Sauerstoffverfügbarkeit im oberirdischen Bereich in periodischen Abständen stark ein, was im natürlichen Habitat von *D. cespitosa* nicht der Fall ist. Aus diesem Grund wurde die Regulation der ADH beider Taxa in Reaktion auf periodische Überflutung in den Blättern untersucht.

ADH wird in der Literatur als Marker für Hypoxie in pflanzlichem Gewebe beschrieben (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Strommer, 2011) und kann somit als Maß für die Sauerstoffverfügbarkeit herangezogen werden. In diesem Experiment wurde ADH auf den drei Ebenen der Genexpression, Proteinmenge und Enzymaktivität untersucht, um ein umfassendes Bild der Regulation des Enzyms in Reaktion auf periodische Überflutung in beiden Taxa zu erhalten. Zusätzlich wurde der Stresszustand der Pflanzen über die Chlorophyllfluoreszenz bestimmt. Dazu wurde mit einem Puls-Amplituden-Modulierten Fluorometer (PAM-Fluorometer) die maximale Quantenausbeute des Photosystem II ( $F_v/F_m$ ) gemessen, da bekannt ist, dass dieser Wert sinkt, wenn Pflanzen im Licht biotischem oder abiotischem Stress ausgesetzt sind (Baker, 2008). Die Messung des  $F_v/F_m$ -Werts ermöglicht somit eine schnelle, nichtinvasive Quantifizierung von Stress (Baker, 2008).

#### Pflanzenmaterial und Kultivierung

Die aus dem Freiland entnommenen Individuen wurden geteilt und die erhaltenen Klone in 8 x 8 cm Töpfe gepflanzt. Dabei wurde das Ausgangssubstrat durch Abspülen der Wurzeln mit Wasser entfernt und durch standardisiertes Substrat bestehend aus einem Drittel Floraton 3 (Floragard, Oldenburg) und zwei Dritteln Sand ersetzt. Zwei Wochen nach dem Umtopfen wurden die Pflanzen mit jeweils einem halben Düngestäbchen NPK-Dünger (Beckmann & Brehm, Beckeln) pro Topf gedüngt.

Vor Versuchsbeginn wurden die Individuen zur Akklimatisierung mindestens fünf Wochen unter kontrollierten Bedingungen in einer Klimakammer kultiviert. Die Lichtperiode betrug 13 h (von 8:00 bis 21:00 Uhr) mit einer photosynthetisch aktiven Strahlung (PAR, engl. photosynthetically active radiation) von etwa 200  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> auf Höhe der Substratoberfläche und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70 % in der Lichtperiode und 80-90 % im Dunkeln. Die Lufttemperatur betrug in der Lichtperiode 22 °C und im Dunkeln 16 °C.

#### Überflutungsanlage: Kunststofftonnensystem

In einer Klimakammer wurde unter den oben genannten Licht-, Luftfeuchtigkeits- und Temperaturbedingungen (siehe oben: Abschnitt "Pflanzenmaterial und Kultivierung") eine Versuchsanlage aufgebaut, die eine Tidesimulation ermöglichte. Dazu wurden 50 L Kunststofftonnen mit einer Höhe von 55 cm und einem Durchmesser von 44 cm verwendet, in die Gräser in 8 x 8 cm Töpfen gestellt wurden. Die Töpfe waren von unten wasserdurchlässig, um unerwünschte Staunässe zu vermeiden. Bei der Kontrollvariante wurde das Substrat der Pflanzen in den Tonnen feucht gehalten ohne Staunässe zu erzeugen. Zur Simulation einer tidebedingten periodisch wiederkehrenden Überflutung wurden zusätzliche Tonnen aufgestellt, die als Wasserspeicher dienten. Zweimal täglich (00:00 Uhr und 12:00 Uhr) wurde das Wasser mit Hilfe von Kreiselpumpen (Universal-Kreiselpumpe 1046, Eheim, Deutschland) aus dem Speicher in die mit Pflanzen bestückte Tonne gepumpt, sodass die Gräser vollständig überflutet wurden. Jeweils nach fünf Stunden (05:00 Uhr und 17:00 Uhr) wurde das Wasser zurück in die Speichertonne gepumpt (Abbildung 3). Jeder Pumpvorgang dauerte etwa 10 min.



**Abbildung 3: Schema der Kunststofftonnen-Überflutungsanlage.** Kontrolle: feuchtes Substrat, ohne Staunässe; Tide: periodische Überflutung mit siebenstündigen Phasen an der Luft von 05 - 12 Uhr und 17 - 24 Uhr (A) und fünfstündigen Phasen vollständiger Überflutung von 00 - 05 Uhr und 12 - 17 Uhr (B).

Es wurden jeweils zwei Tonnen für die Kontrollen und zwei für die periodisch überfluteten Pflanzen aufgestellt und in jeder Tonne vier Pflanzen (zwei jedes Taxons) platziert, sodass in jeder Variante vier *D. cespitosa-* und vier *D. wibeliana-*Pflanzen eingesetzt wurden. Es waren jeweils zwei Pflanzen aus jeder der vier Freilandpopulationen vertreten. In beiden Varianten wurden jeweils genetisch korrespondierende Pflanzen verwendet, da jeweils Horste geteilt und die erhaltenen Klone auf die zwei Varianten verteilt wurden.

Für die Bewässerung und Überflutung wurde Leitungswasser mit einem pH-Wert von 7,8 verwendet (für die Zusammensetzung des Wassers siehe Anhang 1). Alle zwei Wochen wurde die gesamte Anlage gereinigt und das Wasser ausgetauscht. Außerdem wurden die Speichertonnen für das Überflutungswasser dauerhaft lichtdicht abgedeckt, um ein Algenwachstum zu minimieren.

#### **Experimentelles Design**

Um den unmittelbaren Einfluss eines erstmaligen Überflutungsereignisses auf die ADH-Aktivität zu untersuchen, wurden bei einem initialen Überflutungsereignis in der etablierten Überflutungsanlage (siehe oben: Abschnitt "Überflutungsanlage: Kunststofftonnensystem") Blattproben zu den folgenden vier Zeitpunkten genommen: direkt vor Beginn der Überflutung (12:00 Uhr, Zeitpunkt A), nach zwei Stunden Überflutung (14:00 Uhr, Zeitpunkt B), nach vier Stunden Überflutung (16:00 Uhr, Zeitpunkt C) und zwei Stunden nach Ende der Überflutung (19:00 Uhr, Zeitpunkt D). Die Probenahme zu Zeitpunkt B und C erfolgte unter Wasser. Zeitgleich wurden immer auch Proben genetisch korrespondierender nicht überfluteter Pflanzen genommen. Der Stichprobenumfang betrug n = 3.

Der längerfristige Einfluss periodisch wiederkehrender Überflutung auf die Aktivität der ADH wurde im Verlauf von drei Wochen untersucht. Die Pflanzen wurden wie im Abschnitt "Überflutungsanlage: Kunststofftonnensystem" beschrieben zweimal täglich für jeweils fünf Stunden vollständig überflutet und nach einer, zwei und drei Wochen wurden jeweils zum Zeitpunkt C (s.o.) Blattproben genommen. Der Stichprobenumfang betrug in der ersten Woche n = 3, in der zweiten Woche n = 4 und in der dritten Woche n = 17.

Nach drei Wochen periodisch wiederkehrender Überflutung wurden neben der Aktivität auch die Proteinmenge und die Genexpression der ADH untersucht. Die Untersuchung der Genexpression wurde von Volker Ambroselli (Ambroselli, 2013) durchgeführt. Um die Situation unter Normoxie und während eines Überflutungsereignisses vergleichen zu können, wurden Blattproben zu den Zeitpunkten A und C (s.o.) genommen. Außerdem wurde der Stichprobenumfang für die Messung der ADH-Aktivität auf n = 17 erhöht um eine stärkere Aussagekraft der Ergebnisse zu erreichen.

Die maximale Quantenausbeute des Photosystem II (PS II) ( $F_v/F_m$ ) wurde vor Beginn der periodischen Überflutung, nach zwei und nach vier Wochen bestimmt. Der  $F_v/F_m$ -Wert wurde mit dem PAM-2100 immer morgens kurz vor Beginn der Lichtperiode in der Klimakammer gemessen, sodass die Blätter vor der Messung 9 h völliger Dunkelheit ausgesetzt und somit dunkeladaptiert waren. Vor Einschalten der Beleuchtung wurden die Pflanzen aus der Klimakammer entnommen und bis zur Messung weiter im Dunkeln gehalten. Bei jeder Pflanze wurde der  $F_v/F_m$ -Wert an drei Blättern gemessen. Der Mittelwert aus den drei Messungen wurde anschließend als Einzelwert der Pflanze behandelt. Der Stichprobenumfang betrug n = 4.

#### 2.2.2. Reziprokes Verpflanzungsexperiment im Freiland

Zur Überprüfung der Laborergebnisse im Freiland wurde ein reziprokes Verpflanzungsexperiment durchgeführt. Dabei wurde die ökophysiologische Relevanz der Ergebnisse aus der Klimakammer überprüft und gleichzeitig physiologische Reaktionen auf multiple abiotische und biotische Faktoren im Freiland untersucht. Es sollte außerdem festgestellt werden, ob es beiden Taxa möglich ist, im Habitat des Schwestertaxons zu überleben. Neben physiologischen Reaktionen wurden auch vergleichende Analysen der Blattmorphologie durchgeführt und deren Veränderung in Anpassung an die veränderten Bedingungen im fremden Habitat untersucht. Planung und Durchführung des Verpflanzungsexperiments wurden in Zusammenarbeit mit Volker Ambroselli (Ambroselli, 2013) realisiert.

#### Pflanzenmaterial und Versuchsstandorte

In einem reziproken Verpflanzungsexperiment im Freiland wurde der Einfluss tidebedingter Überflutung direkt an natürlichen Standorten beider Taxa untersucht. Dabei wurden die Standorte Kollmar für D. wibeliana und Krempermoor für D. cespitosa ausgewählt (siehe Abschnitt 2.1.). Zunächst wurden von jedem Taxon 15 Pflanzen im Freiland entnommen, diese jeweils in zwei Teile geteilt und ein Teil in das Substrat aus Kollmar und der andere in das Substrat aus Krempermoor in 11 x 11 cm Töpfe gepflanzt. Nach einer einwöchigen Kultivierung im Freien am Biozentrum Klein Flottbek wurden an beiden Standorten, jeweils mit entsprechendem Substrat, 15 Pflanzen jedes Taxons in den Töpfen ausgepflanzt, sodass genetisch identische Pflanzen an beiden Standorten vorhanden waren. Im Krempermoor erfolgte die Verpflanzung auf einer Feuchtwiese mit staunassen Perioden im Jahresverlauf, während in Kollmar eine tidebeeinflusste Süßwasser- bis oligohaline Marsch mit einer Elbwasser-Salinität von 0,23 - 1,44 (Mittel: 0,57; Messstelle Grauerort, Strom-km 660,6; Daten der FGG Elbe, 2013) genutzt wurde (siehe B & C in Abbildung 2). An beiden Versuchsstandorten waren unmittelbar am Verpflanzungsort Populationen des jeweils heimischen Taxons vorhanden. Am Standort Kollmar wurde außerdem ein Wasserstandsdatenlogger (Mini-Diver, Schlumberger Water Services, Delft, Niederlande) in einem Kunststoffrohr in den Boden eingebracht, um über den durch die über dem Logger befindliche Wassersäule entstehenden Druck die Überflutungshöhe im Verlauf des Experiments aufzuzeichnen. Mit einem weiteren Datenlogger wurden zeitgleich der Luftdruck und die Lufttemperatur in ca. 2 m Höhe aufgezeichnet.

#### **Experimentelles Design**

Die Verpflanzung erfolgte im August 2012 und die letzten Messungen erfolgten neun Monate später im Mai 2013. Es wurden kurzfristige Stressantworten über die Bestimmung der ADH-Aktivität und Messung der photosynthetischen Effektivität untersucht. Außerdem wurde ein aufgetretener starker Pilzbefall an den Versuchspflanzen im Krempermoor quantifiziert. Längerfristige Anpassungen wurden vor allem auf morphologischer Ebene der Blätter untersucht. Zusätzlich wurden erneut Messungen zur photosynthetischen Effektivität vorgenommen und in Kollmar die Deckung als Maß für die Biomasse bestimmt.

Die Messungen der ADH-Aktivität erfolgten nach ein, zwei, drei, vier und sechs Wochen mit einem Stichprobenumfang von n = 6 (siehe Abschnitt 2.3.1.). Nach vier Wochen wurden zusätzlich Proben von sechs wild wachsenden und vom Versuch unbeeinflussten Pflanzen beider Taxa aus der unmittelbaren Umgebung der Versuchsstandorte ausgewertet, um den Einfluss der Verpflanzung zu untersuchen. Die Probenahme erfolgte wie im Abschnitt 2.3.1.2. beschrieben.

Zur Bestimmung der photosynthetischen Effektivität wurden mit dem PAM-Fluorometer (PAM-2000 und PAM-2100, Walz, Effeltrich, Deutschland) verschiedene Photosynthese-Parameter bestimmt. Zur Einschätzung der Lichtsättigungseigenschaften beider Taxa im Freiland wurden nach zwei Wochen im Krempermoor Lichtsättigungskurven aufgezeichnet (siehe Abschnitt 2.3.2.3.). Dabei wurde immer parallel mit einem PAM-2000 und einem PAM-2100 gemessen. Der Stichprobenumfang betrug n = 3. Nach drei und sechs Wochen sowie nach neun Monaten wurden mit dem PAM-2100 an beiden Standorten Induktionskurven beider Taxa mit einem Stichprobenumfang von n = 6 aufgenommen (siehe Abschnitt 2.3.2.2.). Für die Induktion der Photosynthese wurde eine photosynthetisch aktive Strahlung (PAR, engl. photosynthetically active radiation) von 357 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> genutzt. Außerdem wurde nach vier Wochen die maximale Quantenausbeute des PS II (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) mit einem Stichprobenumfang von n = 15 gemessen (siehe Abschnitt 2.3.2.1.).

Die blattmorphologischen Untersuchungen erfolgten nach drei und sechs Wochen sowie nach neun Monaten. Dabei wurden Blattparameter untersucht, die bereits in früheren Studien mit dem Gasaustausch unter Wasser bzw. der Anpassung an Überflutung in Verbindung gebracht werden konnten. Die spezifische Blattfläche (SLA), die man durch Division der Blattfläche durch die Trockenmasse erhält, steigt in vielen Arten bei Akklimatisierung an Überflutung (Mommer et al., 2007). Die Blattporosität korreliert positiv mit der Kapazität der Pflanzen zur internen Gasdiffusion und es ist bekannt, dass diese bei intoleranten Arten in

auf Überflutung Reaktion abnimmt (Mommer al., 2007). et Die gemessene Blatthydrophobizität beschreibt die wasserabweisenden Eigenschaften der Blätter. Eine hohe Blatthydrophobizität führt zur Ausbildung eines Gasfilms unter Wasser (Pedersen et al., 2009; Verboven et al., 2014), der wiederum den Gasaustausch der überfluteten Pflanzen verbessert (Pedersen et al., 2009; Winkel et al., 2011). Für eine detaillierte Betrachtung der außerdem Blattquerschnitte Blattmorphologie wurden angefertigt und diese lichtmikroskopisch untersucht. Es wurden Gasfilmdicke, Blattporosität, spezifische Blattfläche und Blatthydrophobizität mit einem Stichprobenumfang von n = 4 bestimmt. Zusätzlich wurden nach sechs Wochen und neun Monaten Blattquerschnitte zur lichtmikroskopischen Untersuchung mit einem Stichprobenumfang von n = 3 angefertigt (siehe Abschnitt 2.3.5.5.). Von den pro Taxon und Standort untersuchten drei Pflanzen wurden jeweils drei Blätter untersucht und an jedem untersuchten Blatt Querschnitte an drei Stellen angefertigt.

Zur Quantifizierung eines starken Pilzbefalls der Versuchspflanzen im Krempermoor wurde nach sechs Wochen der prozentuale Anteil der befallenen Blätter bei allen Pflanzen ausgezählt (n = 15) und nach Intensität kategorisiert (siehe Abschnitt 2.3.7.).

Nach neun Monaten wurde die Deckung der Versuchspflanzen als Maß für die Biomasse in Kollmar anhand von Fotos aus der Aufsicht bestimmt (siehe 3.3.6. Deckung). Der Stichprobenumfang betrug n = 9.

# 2.2.3. Weiterführende Experimente zur Unterwasser-Photosynthese und dem Unterwasser-Gasaustausch

In weiteren Experimenten im Labor sollte untersucht werden, ob die im Freiland gefundene Akklimatisierung der Blätter auch unter kontrollierten Bedingungen nachgewiesen werden kann. Im Unterschied zu multiplen divergierenden Faktoren zwischen den Standorten im Freiland sollte hier nur der Einfluss der periodischen Überflutung betrachtet werden. Zusätzlich sollten die Auswirkungen der veränderten Morphologie akklimatisierter Blätter auf den Unterwasser-Gasaustausch und damit auch auf die Unterwasser-Photosynthese und den pflanzeninternen Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) untersucht werden. Dazu wurde eine weiterentwickelte Überflutungsanlage aus Plexiglasröhren entworfen und maßgefertigt.

# 2.2.3.1. Klimakammerexperiment zur Untersuchung der Unterwasser-Photosynthese und der morphologischen Akklimatisierung

#### Pflanzenmaterial und Kultivierung

In diesem Versuchsaufbau wurden Pflanzen von zwei Populationen aus dem Freiland eingesetzt. Pflanzen von *D cespitosa* stammten vom Standort Krempermoor und *D. wibeliana*-Pflanzen vom Standort Kollmar (siehe Abschnitt 2.1.). Außerdem wurden im Unterschied zur ersten Überflutungsanlage die Pflanzen hier in hydroponischer Kultur gehalten. Dazu wurde ein hydroponisches Kultursystem etabliert, bei dem die Pflanzen in Kunststoffbehältern mit einem Volumen von 5 L in einer modifizierten Hoagland-Nährlösung (für die Zusammensetzung siehe Anhang 2) kultiviert wurden. Die Nährlösung wurde halbkonzentriert eingesetzt und zur Verringerung des Sauerstoffeintrags über Diffusion aus der Luft, mit 0,1 % (w/v) Agar-Agar versetzt. Die Deckel der Behälter verfügten über jeweils zehn Löcher mit einem Durchmesser von 18 mm, in denen die Pflanzen mit Schwammstopfen so fixiert wurden, dass die Wurzeln vollständig in der Nährlösung hingen und die Sprosse und Blätter aufrecht aus dem Behälter herausstanden. Die Außenseiten der Kunststoffbehälter und der Deckel wurden schwarz gefärbt, um das Eindringen von Licht und damit einhergehendes Algenwachstum in der Nährlösung zu minimieren.

Vier Wochen vor Versuchsbeginn wurden die aus dem Freiland entnommenen Individuen geteilt und die erhaltenen Klone ins oben beschriebene hydroponische System überführt. Es erfolgte kein aktives Durchlüften der Nährlösung. Flüssigkeitsverlust der Nährlösung wurde alle zwei Tage durch destilliertes Wasser ausgeglichen und alle zwei Wochen wurde die Nährlösung vollständig ausgetauscht. Die Kultivierung erfolgte in einer Klimakammer mit einer Lichtperiode von 13 h (von 8:00 bis 21:00 Uhr) mit einer PAR von etwa 200  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> auf Höhe der Substratoberfläche und einer Luftfeuchtigkeit und Temperatur von 60-70 % und 22 °C in der Lichtperiode und 80-90 % und 16 °C im Dunkeln.

#### Überflutungsanlage: Plexiglasröhrensystem

Die Überflutungsanlage wurde in einer Klimakammer unter den oben genannten Licht-, Luftfeuchtigkeits- und Temperaturbedingungen betrieben (siehe Pflanzenmaterial und Kultivierung in Abschnitt 2.2.1.) und bestand aus aufrecht stehenden Plexiglasröhren mit einem Außendurchmesser von 20 cm, Innendurchmesser von 19,2 cm und einer Höhe von 80 cm. Für die Überflutungsanlage wurden die Pflanzen vor Versuchsbeginn in kleinere Behälter mit einem Volumen von 1 L überführt. Das Nährmedium (halbkonzentrierte Hoagland-Nährlösung + 0,1 % (w/v) Agar-Agar, siehe Anhang 2) wurde erneuert und die Pflanzen wurden mit wiederablösbarer Klebemasse (UHU patafix, UHU, Bühl/Baden, Deutschland) anstelle von Schwammstopfen am Wurzel-Spross Übergang fixiert, um den Bereich abzudichten und einen Austausch zwischen Überflutungswasser und Nährmedium im Versuchsverlauf zu minimieren. In jeder der Überflutungsröhren wurde einer dieser hydroponischen Kulturbehälter eingesetzt, in denen sich jeweils eine *D. cespitosa*- und eine *D. wibeliana*-Pflanze befand. Für Überflutungs- und Kontrollvariante (ohne Überflutung) wurden jeweils korrespondierende Klone eingesetzt, sodass in beiden Varianten genetisch identische Pflanzen vorhanden waren.



Abbildung 4: Plexiglasröhrensystem zur Simulation periodischer Überflutung unter kontrollierten Bedingungen. Die Pflanzen in den fünf Überflutungsröhren (im Vordergrund) wurden zweimal täglich für jeweils 5 h überflutet, während Kontrollpflanzen in fünf weiteren Röhren nicht überflutet wurden (im Hintergrund). In jeder der zehn Röhren wurde ein hydroponisches Kultursystem mit jeweils einer *D. cespitosa*und einer *D. wibeliana*-Pflanze platziert. Die Überflutung erfolgte mit artifiziellem Überflutungsmedium nach Smart & Barko (1985; pH 7,8; siehe Tabelle 1). Das Überflutungswasser wurde aktiv mit einer Kreiselpumpe aus einem Wasserspeicher in die Verteilerröhre gepumpt (roter Pfeil) und von da aus passiv auf die Überflutungsröhren verteilt (blaue Pfeile). Zum Beenden der Überflutung wurde das Wasser aus der Verteilerröhre zurück in den Speicher gepumpt, floss dadurch passiv aus den Überflutungsröhren zurück in die Verteilerröhre und wurde dort abgepumpt.
## Material und Methoden

Die Versuchspflanzen wurden in fünf Röhren überflutet, die am Grund über Silikonschläuche mit einer Verteilerröhre verbunden waren, die in den Abmessungen den Überflutungsröhren entsprach. Weitere fünf nicht verbundene Röhren wurden für die nicht überfluteten Kontrollpflanzen verwendet. Zur Initiierung eines Überflutungsereignisses wurde artifizielles Überflutungswasser (pH 7,8; Smart & Barko, 1985; siehe Tabelle 1) aus einem Wasserspeicher mit einer Kreiselpumpe (Universal-Kreiselpumpe 1046, Eheim, Deizisau, Deutschland) in die Verteilerröhre gepumpt und von dort passiv über die Silikonschläuche in die Überflutungsröhren weitergeleitet und verteilt. Die Höhe des Wasserstands in den Überflutungsröhren während eines Überflutungsereignisses wurde auf 70 cm eingestellt, sodass alle Pflanzen vollständig überflutet wurden und kein Luftkontakt mehr bestand. Zum Beenden einer Überflutungsperiode wurde das Überflutungswasser aus der Verteilerröhre zurück in den Wasserspeicher gepumpt, wodurch das Wasser aus den Überflutungsröhren passiv in die Verteilerröhre zurückfloss und von dort abgepumpt wurde. Alle zwei Tage wurde die Nährlösung mit destilliertem Wasser und das Überflutungsmedium mit artifiziellem Überflutungswasser (pH 7,8; Smart & Barko, 1985; siehe Tabelle 1) aufgefüllt sowie dessen pH Wert mit 0,1 M HCl auf 7,8 eingestellt. Nach zwei Wochen wurde einmalig das gesamte Überflutungswasser ausgetauscht und die Überflutungsanlage gereinigt.

Tabelle1:ChemischeZusammensetzungdesÜberflutungsmediums ("general purpose medium" nachSmart & Barko, 1985).DIC:gelöster anorganischerKohlenstoff, engl. dissolved inorganic carbon.

Parameter	Konzentration
	(mmol L <sup>-1</sup> )
<b>Ca</b> <sup>2+</sup>	0,62
Cl	1,24
Mg <sup>2+</sup>	0,28
<b>SO</b> <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,28
DIC (bei pH 7,35)	2,20
CO <sub>2</sub> (bei pH 7,35)	0,200
DIC (bei pH 7,80)	2,06
CO <sub>2</sub> (bei pH 7,80)	0,071

#### **Experimentelles Design**

Nach dreiwöchiger periodisch wiederkehrender Überflutung wurden photosynthetische Effizienz, Unterwasser-Photosyntheseleistung und Veränderungen der Blattmorphologie gemessen. Dabei wurden alle Messungen an denselben Pflanzen durchgeführt.

Die Messung der photosynthetischen Effizienz erfolgte mit dem Imaging-PAM Fluorometer. Das ermöglichte die simultane Messung von je drei Blättern einer *D. cespitosa*und einer *D. wibeliana*-Pflanze. Es wurden jeweils vor und nach einem fünfstündigen Überflutungsereignis Induktionskurven bei einer PAR von 110  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> aufgezeichnet (siehe Abschnitt 2.3.2.2.). Alle Werte wurden 5 cm von der Blattspitze entfernt bestimmt und pro Pflanze wurden drei Blätter untersucht, deren Mittelwert als Einzelwert weiterverwendet wurde. Der Stichprobenumfang betrug n = 4 (vier untersuchte Pflanzen pro Versuchsgruppe).

Für die Messungen der Unterwasser-Photosynthese und –Dunkelatmung wurden die Pflanzen morgens aus der Überflutungsanlage entnommen. Zunächst wurde die  $O_2$ -Produktion unter Wasser und anschließend die Unterwasser-Dunkelatmung gemessen (siehe Abschnitt 2.3.3.). Dazu wurde jeweils ein 5 cm Blattstück aus der Blattmitte verwendet. Der Stichprobenumfang betrug n = 4.

Außerdem sollte überprüft werden, ob die im Freiland gefundene Akklimatisierung der *D. cespitosa*-Blätter auch unter kontrollierten Bedingungen im Laborversuch als Reaktion auf periodische Überflutung nachgewiesen werden kann. Dazu wurden Veränderungen der Blattmorphologie nach drei Wochen periodisch wiederkehrender Überflutung an vier Pflanzen pro Versuchsgruppe gemessen (n = 4). Von jeder Pflanze wurden sechs 5 cm Blattstücke aus der Blattmitte verwendet und die spezifische Blattfläche (SLA), Gasfilmdicke und Blattporosität bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.5.).

#### 2.2.3.2. Gewächshausexperiment zum Unterwasser-Gasaustausch

Für die direkte Messung des  $pO_2$  im pflanzlichen Gewebe wurde ein Gewächshausexperiment im "Freshwater Biology Laboratory" der Universität Kopenhagen unter Anleitung von Ole Pedersen durchgeführt, der über eine große Expertise bei Messungen mit Mikroelektroden in pflanzlichem Gewebe verfügt (siehe u.a. Pedersen et al., 2006; Colmer & Pedersen, 2008a; Pedersen et al., 2013; Herzog & Pedersen, 2014).

Um die Auswirkungen der veränderten Morphologie akklimatisierter Blätter auf den Unterwasser-Gasaustausch und die interne Sauerstoffversorgung unter Wasser zu untersuchen, wurde der pflanzeninterne  $pO_2$  im Verlauf einer Überflutungsphase in zuvor

periodisch überfluteten und zuvor nicht überfluteten Pflanzen gemessen. Neben Unterschieden zwischen akklimatisierten und nicht akklimatisierten Blättern wurden außerdem Unterschiede zwischen beiden Taxa und Auswirkungen der Unterwasser-Photosynthese auf den internen pO<sub>2</sub> untersucht. Da eine direkte Messung des pO<sub>2</sub> im Blattgewebe insbesondere bei den in dieser Studie untersuchten Taxa technisch sehr schwierig ist, wurde der pO<sub>2</sub> in Adventivwurzeln gemessen. Die Schwierigkeit ergibt sich einerseits aus der geringen Blattdicke (45-60 µm in den Blattriefen und 280-480 µm an den Blattrippen; siehe auch Abbildung 33 und 34). Andererseits ist es aufgrund der Riefenstruktur der Blätter beider *Deschampsia*-Taxa schwierig, die genaue Position der O<sub>2</sub>-Mikroelektrode in einem spezifischen Gewebe anhand der Einstichtiefe zu ermitteln. Zusätzlich erschwert wird das Einstechen in die Blätter durch die harten Zellwände und hohen Sklerenchymanteile.

Es ist bekannt, dass der  $pO_2$  in Wurzeln schnelle und signifikante Veränderungen in Reaktion auf Manipulationen im Sprossbereich, wie Überflutung, Licht oder Entfernen des Gasfilms, zeigt, solange ein ausreichender interner Gastransport gewährleistet ist (Colmer & Pedersen, 2008a; Pedersen et al., 2009; Herzog & Pedersen, 2014). Daher lassen sich auch anhand des  $pO_2$  im Wurzelaerenchym Aussagen über Veränderungen des Gasaustauschs und der  $O_2$ -Produktion in den Blättern treffen. Um eine Positionierung der  $O_2$ -Mikroelektrode im Aerenchym der Wurzeln zu erleichtern, wurde zunächst die Wurzelmorphologie untersucht.

#### Pflanzenmaterial und Kultivierung

Für die Durchführung des Versuchs wurden Pflanzen aus Hamburg nach Kopenhagen überführt. Es wurden Pflanzen aus den Populationen Kollmar für *D. wibeliana* und Krempermoor für *D. cespitosa* eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in einem hydroponischen System wie im Abschnitt 2.2.3.1. beschrieben mit dem Unterschied, dass die Pflanzen in einem Gewächshaus kultiviert wurden. Die Kultivierungsdauer im Gewächshaus vor Versuchsbeginn betrug drei Wochen. Temperatur und Lichtintensität wurden in zwei Kontroll- und zwei Überflutungsröhren mit einem wasserdichten Datenlogger (HOBO Pendant, Onset, Bourne, MA, USA) im Versuchsverlauf aufgezeichnet.

#### Überflutungsanlage: Plexiglasröhrensystem

Der Betrieb der Überflutungsanlage erfolgte wie im Abschnitt 2.2.3.1. beschrieben, mit den Unterschieden, dass alle zwei Tage die Nährlösung in den Kultivierungsbehältern mit artifiziellem Überflutungswasser (pH 7,8; Smart & Barko, 1985; siehe Tabelle 1) aufgefüllt wurde und ein Drittel des Überflutungswassers ausgetauscht sowie der pH des gesamten Überflutungswassers mit CO<sub>2</sub> wieder auf 7,8 eingestellt wurde.

#### **Experimentelles Design**

Nach sechs und acht Wochen wurde der  $pO_2$  im Wurzelaerenchym im Verlauf eines Überflutungsereignisses gemessen (siehe Abschnitt 2.3.4.). Zuvor wurde bei Pflanzen, die in der Röhren-Überflutungsanlage in der Klimakammer in Hamburg drei Wochen periodisch überflutet wurden, die Wurzelmorphologie untersucht, um den radiären Wurzelaufbau einschätzen zu können und so die nötige Einstechtiefe der Mikroelektroden zu ermitteln (siehe Abschnitt 2.3.4.1.).

Nach sechs Wochen wurde der  $pO_2$  im Wurzelaerenchym im Verlauf eines Überflutungsereignisses bei drei Zuständen gemessen: Spross und Blätter an der Luft im Dunkeln, Spross und Blätter vollständig überflutet im Dunkeln und im Licht. Nach acht Wochen wurden nur die beiden Zustände im Dunkeln gemessen. Zusätzlich wurden die Pflanzen hier eine Woche vor Beginn der Messungen deoxigenierter Nährlösung ausgesetzt, was durch ein Durchlüften der Nährlösung mit Stickstoff erreicht wurde. Außerdem wurden bei den Messungen nach acht Wochen die Wurzelkammern zusätzlich mit Glasplatten abgedeckt, um den Einfluss der Sauerstoffdiffusion aus der Luft zu minimieren.

Für eine mögliche Erklärung der hohen Variabilität der pO<sub>2</sub>-Werte bei der Messung nach sechs Wochen (Abbildung 52) wurde nach acht Wochen zusätzlich die Allokation der Biomasse auf unterirdische und oberirdische Pflanzenteile untersucht. Eine höhere oberirdische Biomasse führt möglicherweise zu einem erhöhten Gasaustausch und damit einem höheren pO<sub>2</sub>, während eine höhere Wurzelbiomasse zu einem höheren O<sub>2</sub>-Verbrauch durch Atmung führen könnte. Außerdem kann die Allokation der Biomasse Aufschlüsse über Limitationen im oberirdischen oder unterirdischen Pflanzenteil geben, da das Konzept des "funktionalen Equilibriums" besagt, dass Pflanzen größere Biomasseanteile in den Bereich umverteilen, in dem der limitierende Faktor für das Pflanzenwachstum wirkt (Poorter et al., 2012).

## 2.3. Methoden

## 2.3.1. Untersuchungen der Alkoholdehydrogenase in Blättern

Die Untersuchungen zur ADH wurden zu gleichen Teilen in Zusammenarbeit mit Volker Ambroselli (Ambroselli, 2013) durchgeführt.

## 2.3.1.2. Probenahme

Von jedem Individuum wurden 5 cm lange basale Blattsegmente kurz oberhalb der Blattscheide an drei Blättern entnommen. Das Blattmaterial wurde sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

## 2.3.1.3. Extraktion des löslichen Gesamtproteins aus Blättern

Zur Extraktion des löslichen Gesamtproteins aus Blättern wurde in flüssigem Stickstoff gefrorenes Blattmaterial unter weiterer Kühlung mit flüssigem Stickstoff in einer Schwingmühle (MM301, Retsch, Haan) aufgeschlossen und umgehend in 50 mM Kaliumphosphatpuffer [pH 7,5; + 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)] unter Durchmischung auf dem Vortexmischer gelöst. Die Extraktion erfolgte 10 min auf Eis mit zwischenzeitlichem Mischen auf dem Vortexmischer. Anschließend erfolgten zwei Zentrifugationsschritte bei 14.000 x g und 4 °C. Nach der ersten 10 minütigen Zentrifugation wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und einer weiteren 2 minütigen Zentrifugation unterzogen. Der erhaltene Überstand wurde als Proteinextrakt eingesetzt und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt.

## 2.3.1.4. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proteinextrakte wurde die Methode nach Bradford (1976) angewendet. Das Prinzip beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums einer sauren Coomassie Brilliant Blue G-250 Lösung von 465 nm zu 595 nm, wenn der Coomassie Brilliant Blue G-250 Farbstoff an Proteine bindet. Dabei schlägt die Färbung der Lösung von braun nach blau hin um. Das Ausmaß des Farbumschlags und der damit einhergehenden Absorptionszunahme bei 595 nm verhält sich im Bereich von etwa 0-15 μg mL<sup>-1</sup> proportional zur Proteinkonzentration des Proteinstandards Rinderalbumin (BSA, engl. bovine serum albumin, Serva, Heidelberg).

Es wurden Eichgeraden mit BSA im Bereich von 0-10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> erstellt, um anschließend anhand der Extinktionswerte der Proteinextrakte in saurer Coomassie Brilliant Blue G-250

Lösung (Protein Assay Farbstoff Konzentrat, BIO-RAD Laboratories Inc., USA) die Proteinkonzentrationen der Proben zu berechnen.

#### 2.3.1.5. Bestimmung der Alkoholdehydrogenase-Aktivität

Zur Bestimmung der ADH-Aktivität in Blättern wurde die Reaktion von Acetaldehyd zu Ethanol indirekt über die Oxidation des Coenzyms NADH zu NAD<sup>+</sup> gemessen. Dazu wurde die Absorption des Reaktionsansatzes bei 340 nm im Photometer (NanoPhotometer-UV/Vis spectrophotometer, Implen, Westlake Village, CA, USA) gemessen. NADH weist ein Absorptionsmaximum bei 340 nm auf, während NAD<sup>+</sup> bei dieser Wellenlänge nur sehr gering absorbiert. So lässt sich über die Abnahme der Absorption bei 340 nm die Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> messen und anschließend der Substratumsatz in katal (1 katal = 1 mol s<sup>-1</sup>) mit folgender Formel berechnen.

$$A \,[\text{kat}] = \frac{\Delta E \,[\text{s}^{-1}] * V_R[\text{L}] * d \,[\text{cm}]}{\epsilon_{340} \,[\text{L}\,\text{mol}^{-1}\,\text{cm}^{-1}]} \tag{1}$$

- A: Aktivität der ADH
- $\Delta$  E: Extinktionsänderung über die Zeit
- V<sub>R</sub>: Volumen des Reaktionsansatzes
- *d*: Schichtdicke der Küvette = 1 cm
- $\varepsilon_{340}$ : Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm = 6,3\*10<sup>3</sup> L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

Die Messungen wurden bei Raumtemperatur in einem 1 mL Reaktionsansatz durchgeführt. Dazu wurden  $25 - 65 \mu$ L Proteinextrakt (siehe Abschnitt 2.3.1.3.) zu folgendem Reaktionsansatz gegeben: 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5; 1 mM EDTA), 5 mM Magnesiumsulfat, 0,1 mM NADH und 10 mM Acetaldehyd. Vor Zugabe des Substrats Acetaldehyd wurde die Extinktionsänderung für 1 min ohne Substrat gemessen. Dieser Wert wurde am Ende vom gemessenen Wert nach Zugabe des Acetaldehyds subtrahiert. Die Werte nach Zugabe des Substrats wurden im linearen Bereich der Kurve bestimmt, also wenn nach der initialen Bildung der Enzym-Substrat-Komplexe ein Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation erreicht wurde. Um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten wurde die spezifische ADH-Enzymaktivität durch Division durch die eingesetzte Proteinmasse berechnet (siehe Abschnitt 2.3.1.4.) und in nkat mg<sup>-1</sup> angegeben.

#### 2.3.1.6. Bestimmung der ADH-Proteinmenge

Zur Bestimmung der Proteinmenge der ADH wurde lösliches Gesamtprotein aus den Blättern zunächst nach der Molekülmasse in einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) aufgetrennt und dann im Western Blot-Verfahren auf eine Membran übertragen und mit einem ADH-spezifischen Antikörper detektiert.

## Gelelektrophoretische Auftrennung

Für Gelelektrophorese löslichem die wurden jeweils Mischproben aus Gesamtproteinextrakt aus Blättern von drei Individuen hergestellt. Es wurden dieselben Proteinextrakte verwendet wie für die Messung der ADH-Aktivität (siehe Abschnitt 2.3.1.3.). Von jeder Mischprobe wurden 30 µg Protein zunächst in vierfach konzentriertem Solubilisierungspuffer [pH 6,8; 250 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), 40 % (v/v) Glycerin, 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 4 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS, engl. sodium dodecyl sulfate) und 0,01 % (w/v) Bromphenolblau] aufgenommen und 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte in 10 % Acrylamidgelen (Precise Tris-HEPES Gels, Fisher Scientific, Schwerte) in einer Gelkammer (Xcell SureLock, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) mit einem einfach konzentrierten HEPES-Laufpuffer [pH 8,0; 100 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 100 mM Tris und 0,1 % (w/v) SDS]. Der Gellauf wurde 2-2,5 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA durchgeführt. Neben den Blattproteinproben wurde auf jedem Gel ein Proteinmarker (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fisher Scientific, Schwerte) zur Bestimmung des Molekulargewichts der einzelnen Proteinbanden aufgetragen.

## Proteintransfer und immunologischer Nachweis

Die aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung eines basischen Transferpuffers [pH 9,2; 48 mM Trizma-base, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS und 20 % (v/v) Methanol] im semi-dry Verfahren mit der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, München) elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham Bioscience, Freiburg) transferiert. Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur zunächst für 70 min mit einer Stromstärke von 70 mA und weiteren 60 min bei 40 mA. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Nitrocellulosemembran umgehend mit Ponceau-Lösung [0,1 % (w/v) Ponceau S und 1 % Eisessig] und das Agarosegel mit Coomassie-Lösung [0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 10 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure] gefärbt und durch Scannen dokumentiert.

Anschließend wurde die Membran dreimal für je 5 min mit TBS (pH 7,5; 10 mM Tris-HCl und 7,5 mM NaCl) gewaschen. Die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte mit Blockierungspuffer (0,5 % Magermilchpulver in TBS) für eine Stunde. Danach wurde die Membran zweimal für je 5 min in TBS-T [pH 7,5; 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl und 0,1 % (v/v) Tween 20] und einmal für 5 min in TBS gewaschen. Der spezifische Nachweis der ADH erfolgte mit einem polyklonalen primären ADH-Antikörper (Agrisera, Schweden, Art.-Nr.: AS10 685) im Mischungsverhältnis 1:3.000 Vännäs, in Blockierungspuffer (s. o.) über Nacht bei 4 °C. Der Nachweis der großen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RbcL) wurde mit einem polyklonalen primären anti-RbcL Antikörper (Agrisera, Vännäs, Schweden, Art.-Nr.: AS03 037) im Mischungsverhältnis 1 : 2.000 in Blockierungspuffer (s. o.) für eine 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Inkubation mit dem primären Antikörper folgten drei Waschschritte mit TBS-T für je 5 min und eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Pierce Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate, Thermo Scientific, Schwerte, Art.-Nr.: 31460) im Mischungsverhältnis 1:2.000 in TBS. Nach viermaligem Waschen in TBS-T für je 5 min wurde die Membran für 5 min mit Substrat (Super Signal West Dura Substrate, Thermo Scientific, Schwerte, Art.-Nr.: 34075) für die am sekundären Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase (HRP, engl. horseradish peroxidase) in einer Verdünnung von 1:10 in TBS inkubiert. Anschließend wurde die resultierende Chemilumineszenz über einen exponierten Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm MP, GE Healthcare, Freiburg) detektiert.

## 2.3.2. Photosynthese-Effektivität

Zur Bestimmung der Photosynthese-Effektivität wurden verschiedene Photosyntheseparameter über die *in vivo* Chlorophyll-Fluoreszenz bestimmt. Dazu wurden unterschiedliche Typen des PAM-Fluorometers (PAM-2000, PAM-2100, Imaging-PAM M-Series, Walz, Effeltrich, Deutschland) eingesetzt.

Mit dem PAM-Fluorometer wurde die variable Chlorophyll-Fluoreszenz des PS II gemessen. Das Messprinzip beruht auf der Puls-Amplituden-Modulation des Messlichts. Das gepulste Messlicht wird von lichtemittierenden Dioden (LEDs) emittiert und ruft im bestrahlten Blatt ebenfalls gepulste Fluoreszenzsignale des Chlorophylls hervor. Nur diese gepulste Erhöhung der Fluoreszenz wird vom PAM gemessen, wodurch alle Fluoreszenzsignale, die durch andere Lichtquellen hervorgerufen werden, ausgeschlossen

werden. Das Messlicht ist außerdem durch die geringe PAR von etwa 0,3  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> nicht aktinisch, d.h. es bewirkt keine photochemische Reaktion.

#### Messungen mit dem PAM-2000 / 2100 Fluorometer

Für alle Messungen mit dem PAM-2000 und PAM-2100 wurden zur Dunkeladaptation Dark Leaf Clips (DLC-8, Walz) verwendet. Dabei handelt es sich um Aluminiumklemmen, in die ein Blatt eingeklemmt und mit Hilfe eines Schiebeverschlusses die eingeklemmte Blattfläche vollständig abgedunkelt werden kann. Die Fiberoptik des PAM-Fluorometers wurde dabei durch den Dark Leaf Clip (DLC) im Abstand von 7 mm horizontal zur Blattfläche ausgerichtet. Die Intensität des roten Messlichts (650 nm) und die Signalverstärkung wurden so eingestellt, dass der aktuelle Fluoreszenzwert (F<sub>t</sub>) vor Beginn der Messung immer zwischen 300 und 400 lag. Die Intensität des weißen Lichts für die Sättigungspulse betrug etwa 5000  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Als aktinisches Licht für die Induktionskurven und die Lichtsättigungskurven wurde rotes Licht der LEDs eingesetzt.

#### Messungen mit dem Imaging-PAM Fluorometer

Die Messungen mit dem Imaging-PAM wurden mit der MAXI-Version des Geräts und dem zugehörigen Stativ mit Plexiglashaube durchgeführt. Dieses ermöglicht Messungen auf einer Fläche von 10 x 13 cm durch den Einsatz leistungsstarker LEDs in Kombination mit einer hochsensitiven CCD-Kamera im Abstand von 18,5 cm zur Probe. Dadurch lassen sich die gemessenen Parameter sowohl räumlich als auch zeitlich auflösen. Die untersuchten Blätter wurden auf der Blatthalterung des Imaging-PAM in horizontaler Ausrichtung fixiert und bei heruntergelassener Plexiglashaube dunkeladaptiert. Im Gegensatz zum roten Messlicht des PAM-2000 bzw. 2100 wird beim Imaging-PAM blaues Messlicht mit einer Wellenlänge von 450 nm eingesetzt. Die  $F_t$ -Werte wurden vor jeder Messung durch Variieren der Messlichtintensität auf Werte zwischen 0,100 und 0,200 eingestellt. Für das aktinische Licht der Induktionskurven und die Sättigungspulse wurde ebenfalls Blaulicht (450 nm) eingesetzt. Die Sättigungspulse hatten eine photosynthetisch aktive Photonenflussdichte (PPFD, engl. photosynthetically active photon flux density) von etwa 2800  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

## 2.3.2.1. Messung der maximalen Quantenausbeute des PSII (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>)

Die Bestimmung der maximalen Quantenausbeute des PS II  $(F_v/F_m)$  wurde leicht verändert nach Hanelt (1998) durchgeführt. Dazu wurde die von Schreiber et al. (1986) beschriebene Sättigungspuls-Methode angewendet.

Nach einer Dunkeladaptationszeit zwischen 2 und 15 min wurde zunächst das Messlicht eingeschaltet und die minimale Fluoreszenz ( $F_o$ ) bestimmt.  $F_o$  ist definiert als die Fluoreszenz des PS II im dunkeladaptierten Blatt, wenn alle Reaktionszentren des PS II "offen" sind, d.h. bereit sind Energie zu absorbieren und angeregte Elektronen an den primären Akzeptor in der Elektronentransportkette Plastochinon (PQ, engl. plastoquinone) weiterzugeben. Der Plastochinonpool ist zu diesem Zeitpunkt vollständig oxidiert und die Fluoreszenz des PS II ist minimal. Nach Bestimmung von  $F_o$  wurde ein 0,8 s andauernder Sättigungspuls weißen oder blauen Lichts (2800 - 5000 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) auf das Blatt gestrahlt, sodass alle PS II Reaktionszentren "geschlossen" waren und die Fluoreszenz maximal war. In dem Moment wurde die maximale Fluoreszenz ( $F_m$ ) bestimmt. Anschließend wurde die variable Fluoreszenz ( $F_v$ ) berechnet ( $F_v = F_m - F_o$ ), anhand derer die maximale Quantenausbeute des PS II ( $F_v/F_m$ ) durch Division der variablen Fluoreszenz durch die maximale Fluoreszenz berechnet wurde.

$$F_{\nu} = F_m - F_o \tag{2}$$

Durch die abschließende Division von  $F_v$  durch  $F_m$  werden relative Werte erhalten, die unabhängig von Chlorophyllkonzentration oder Messlichtintensität bzw. Signalverstärkung und damit zwischen unterschiedlichen Proben vergleichbar sind.

#### 2.3.2.2. Induktionskurven

Induktionskurven wurden mit dem PAM-2100 und dem Imaging-PAM gemessen. Sie zeigen den Verlauf der Photosyntheseparameter aus einem dunkeladaptierten Zustand kommend hin zu einem stabilen Zustand bei einer konstanten PAR. Dabei wurde zunächst nach einer 15-minütigen Dunkeladaptationsphase der  $F_v/F_m$  Wert gemessen (siehe auch Abschnitt 2.3.2.1.). Nach weiteren 40 s im Dunkeln wurde das Blatt mit aktinischem Licht mit einer konstanten PAR von 110 bzw. 357 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> bestrahlt, sofort ein Sättigungspuls appliziert und die effektive Quantenausbeute des PS II ( $\Phi_{PSII}$ ) bestimmt. Dazu wurde unmittelbar vor dem Sättigungspuls die aktuelle Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand ( $F_m$ ) gemessen. Nach Beginn der aktinischen Bestrahlung wurde für 300 – 320 s alle 20 s ein Sättigungspuls appliziert, F sowie  $F_m$  gemessen und anschließend  $\Phi_{PSII}$  berechnet. Der  $\Phi_{PSII}$ -Wert wird in der Literatur auch als Y(II),  $\Delta F/F_m$  oder  $F_q$ '/ $F_m$ ' bezeichnet (Baker, 2008).

Bei Messungen mit dem PAM-2100 wurde direkt nach jedem Sättigungspuls das aktinische Licht ausgeschaltet und für 3 s dunkelrotes Licht (735 nm) eingeschaltet. Das

dunkelrote Licht sorgt aufgrund des höherwelligen Absorptionsmaximums des PS I (700 nm) im Vergleich zu 680 nm des PS II für eine bevorzugte Anregung des PS I und eine damit einhergehende starke Reoxidation des primären Elektronenakzeptors des PS II ( $Q_A$ ). Die schnelle Reoxidation von  $Q_A$  ermöglicht die Messung der minimalen Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand ( $F_0$ <sup>°</sup>), die im Vergleich zu  $F_0$  herabgesenkt sein kann. Die Messung von  $F_0$ <sup>°</sup> ist notwendig, um den Anteil "offener" PS II-Reaktionszentren (qL) zu berechnen.

qL wurde als Parameter für den Anteil "offener" PS II Reaktionszentren gewählt, da dieser auf einem "Lake-Modell" ("connected units") für die photosynthetischen Einheiten beruht (Kramer et al., 2004). Dieses Modell ist für Blätter Höherer Pflanzen realistischer als das "Puddle-Modell", auf dem der Parameter qP beruht (Kramer et al., 2004). Als Parameter für das nichtphotochemische Quenching wurde NPQ verwendet (Bilger & Björkman, 1990). Außerdem wurde  $\Phi_{PSII}$  als Maß für die Quantenausbeute des PS II und den linearen Elektronenfluss durch das PS II bestimmt (Baker, 2008). Zusätzlich ermöglichen die Parameter  $\Phi_{NPQ}$  und  $\Phi_{NO}$  eine detaillierte Betrachtung des nichtphotochemischen Quenchings (Hendrickson et al., 2004; Kramer et al., 2004), wobei  $\Phi_{NPQ}$  die lichtinduzierten (regulierten) Quenching-Prozesse beschreibt und  $\Phi_{NO}$  die nicht lichtinduzierten (nicht regulierten) Quenching-Prozesse (Kramer et al., 2004; Baker, 2008).

#### 2.3.2.3. Lichtsättigungskurven

Lichtsättigungskurven wurden mit dem PAM-2000 und PAM-2100 gemessen. Sie geben Aufschluss über die aktuellen Lichtsättigungseigenschaften einer Pflanze in Anpassung an die vorherrschenden Lichtbedingungen. Aus diesem Grund wurden die Pflanzen vor dem Starten der Lichtsättigungskurven nicht dunkeladaptiert und die Messung der dunkeladaptierten Parameter erfolgte im Anschluss an die Lichtsättigungskurve. Die Lichtsättigungseigenschaften der Pflanzen wurden anhand der initialen Steigung der Lichtsättigungskurve ( $\alpha$ ), der maximalen Elektronentransportrate (ETR<sub>max</sub>) und dem Punkt, an dem die Lichtsättigung einsetzt, (E<sub>k</sub>) bestimmt. Sie geben Aufschluss über die maximale photosynthetische Effizienz ( $\alpha$ ; Ritchie, 2008), die Adaptation an niedrige Lichtintensitäten (E<sub>k</sub>; Talling, 1957; Platt et al., 1980) und die maximale relative Photosyntheserate (ETR<sub>max</sub>; Schreiber et al., 2012).

Für die Messungen wurden jeweils ein bis zwei Blätter in einen DLC eingeklemmt und sofort das Messprogramm der Lichtsättigungskurve gestartet. Dabei wurden die Blätter in elf Schritten steigenden PAR-Intensitäten von 2-425  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> im PAM-2000 bzw. 2-528  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> im PAM-2100 ausgesetzt. Bei jedem Schritt wurden die Blätter 3 min der neuen

PAR-Intensität ausgesetzt, ein Sättigungspuls appliziert und F und  $F_m$  gemessen. Nach Beenden des letzten Schritts wurden die Blätter im DLC für 10 min dunkeladaptiert und anschließend der  $F_v/F_m$  Wert bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.2.1.).

Zur Bestimmung der Lichtsättigungseigenschaften der untersuchten Pflanzen wurde die Elektronentransportrate (ETR) berechnet, die ein Maß für den linearen Elektronentransport darstellt (Schreiber et al., 1994).

$$ETR = Y(II) * PAR * 0.5 * 0.84$$
(3)

Die Berechnung erfolgt dabei durch Multiplikation des Y(II) mit der auf das Blatt auftreffenden PAR. Es muss beachtet werden, dass für die Anregung zweier Photosysteme zwei Photonen nötig sind, um ein Elektron zu transportieren. Deshalb wird der Wert mit 0,5 multipliziert. Außerdem wird nicht die Gesamtheit der eingestrahlten PAR vom Blatt absorbiert wird, weshalb zusätzlich mit 0,84 multipliziert wird. Bei Studien an Blättern Höherer Pflanzen wird meistens von einer Absorption von 84 % der PAR ausgegangen (Björkman & Demmig, 1987; Schreiber et al., 2012), was durch Studien, in denen gleichzeitig CO<sub>2</sub>-Fixierungsraten gemessen wurden, in gutem Maße bestätigt werden konnte (Genty et al., 1989; Siebke et al., 1997).

Die berechneten ETR-Werte wurden gegen die PAR aufgetragen, um Lichtsättigungskurven für die Elektronentransportrate (ETR) zu erhalten. Um die charakteristischen Parameter maximale Elektronentransportrate (ETR<sub>max</sub>), initiale Steigung ( $\alpha$ ) und Lichtsättigungspunkt (E<sub>k</sub>) zu erhalten wurde der Kurvenverlauf mit folgender Formel nach Peek et al. (2002) modelliert:

$$ETR_t = ETR_{max} * (1 - e^{-a * PAR_t})$$
(4)

Peek et al. (2002) nutzten folgende Formel (verändert nach Potvin et al., 1990), um Kurvenverläufe der CO<sub>2</sub>-Aufnahme gegen die PAR-Intensität zu modellieren:

$$A = A_{max} * [1 - e^{-A_{qe} * (PPF - LCP)}]$$
(5)

Die Antwortvariable A wird anhand der Asymptote der Photosynthese bei Starklicht  $(A_{max})$ , der initialen Steigung  $(A_{qe})$  und des photosynthetischen Photonenflusses (*PPF*) abzüglich des Lichtkompensationspunkts (*LCP*, engl. light compensation point) berechnet. Bei der Bestimmung der Elektronentransportrate ist keine Messung eines LCP möglich, da es keine negative Elektronentransportrate gibt wenn die CO<sub>2</sub>-Abgabe die CO<sub>2</sub>-Fixierung übersteigt. Daher wurde in diesem Fall der LCP in der Formel 5 nicht einbezogen und lediglich die PAR zum Zeitpunkt t (*PAR<sub>t</sub>*) herangezogen. Zur Anpassung der Kurvenfunktion

an die Daten wurde das Add-In Solver in dem Programm Excel (Microsoft Office Excel 2007, Microsoft, Redmond, WA, USA) genutzt und damit die Bestimmung der Werte der Parameter  $ETR_{max}$  und *a* nach der Methode der geringsten Abweichungsquadrate optimiert. Anschließend wurde  $\alpha$  mittels einer linearen Regression durch die ersten vier Messpunkte ermittelt und der E<sub>k</sub> berechnet:

$$E_k = \frac{ETR_{max}}{\alpha} \tag{6}$$

## 2.3.3. Unterwasser-Photosynthese und -Dunkelatmung

Zur Bestimmung der Netto-Unterwasser-Photosyntheseleistung und Unterwasser-Dunkelatmung wurde die Sauerstoffabgabe bzw. -aufnahme von Blattteilen unter Wasser mit O<sub>2</sub>-Sensorpunkten und einem Glasfasersauerstofftransmitter (Fibox 3, PreSens, Regensburg, Deutschland) gemessen. Dazu wurde ein O<sub>2</sub>-Sensorpunkt (oxygen sensor spot, PreSens, Regensburg, Deutschland) mit Silikonklebstoff an die Innenseite eines 47 mL Glasfläschchens geklebt. Das Glasfläschchen war über einen Glasstopfen mit Schliff luftdicht verschließbar und wurde zur Vermeidung starker Temperaturschwankungen in einem Wasserbad mit einem Volumen von 3,5 L platziert. Zur besseren Temperaturverteilung wurde das Wasserbad während der Messungen mit einem Magnetrührer durchmischt. Die Kalibrierung des Sensorpunkts erfolgte bei den Sauerstoffpartialdrücken (pO<sub>2</sub>) 0 % Luftsättigung (air sat., engl. air saturation) und 100 % air sat. Der 0 %-Punkt wurde in einer 80 mM Natriumsulfitlösung gemessen, das Glasfläschchen anschließend dreimal mit destilliertem Wasser gespült und anschließend die 100 %-Messung mit destilliertem Wasser, das zuvor 10 min mit Umgebungsluft durchlüftet worden war, durchgeführt.

Die Messungen erfolgten nach den Empfehlungen von Pedersen et al. (2013) in einem artifiziellen Überflutungsmedium (Smart & Barko, 1985; Tabelle 1) mit einem pH Wert von 7,35 zu Beginn der Messung, einer Konzentration gelösten anorganischen Kohlenstoffs (DIC, engl. dissolved inorganic carbon) von 2,2 mmol L<sup>-1</sup> und einer konstanten Gesamtalkalinität von 2 mmol H<sup>+</sup> Äquivalente L<sup>-1</sup>. Somit standen bei einer Temperatur von 20 °C 200 µmol L<sup>-1</sup> freies CO<sub>2</sub> zur Verfügung (CurTiPot Software; Gutz, 2013). Um im Versuchsverlauf keine photosynthetisch bedingte Übersättigung des Mediums mit Sauerstoff zu erreichen und den Einfluss von Photorespiration zu minimieren, wurde das Medium mit einem pO<sub>2</sub> von etwa 50 % air sat. eingesetzt. Dazu wurde es vor Versuchsbeginn, nach Zugabe von Magnesiumsulfat und Calciumchlorid, aufgeteilt und für 20 min eine Hälfte mit Umgebungsluft und die andere Hälfte mit Argon durchlüftet. Anschließend wurden beide

Lösungen wieder vereint, der DIC in Form von Kaliumhydrogencarbonat hinzugefügt und der pH Wert mit HCl auf 7,35 eingestellt.

Für die Messung wurde das Medium vorsichtig mit einer Spritze in das Glasfläschchen gefüllt, um eine Anreicherung mit Sauerstoff aus der Umgebungsluft zu minimieren. Dabei wurde das Fläschchen so hoch befüllt, dass es beim Aufsetzen des Glasstopfens mit eingefettetem Schliff überlief und somit keine Lufteinschlüsse vorhanden waren. Während aller Messungen wurde das Medium mit einem Magnetrührstäbchen auf einem Magnetrührer durchmischt. Um eine Sauerstofffreisetzung aus der Teflonummantelung des Magnetrührstäbchens zu vermeiden wurden ausschließlich glasummantelte Rührstäbchen verwendet. Zunächst wurde für 10-15 min ein Leerwert gemessen, der am Ende von den Messwerten der Netto-Photosynthese und Dunkelatmung subtrahiert wurde. Bei allen Messungen wurde ein Messintervall von 10s verwendet und eine geräteinterne Temperaturkompensation mit Hilfe des angeschlossenen Temperatursensors durchgeführt. Dann wurde ein 5 cm langes Blattstück aus der Blattmitte an einer Metallklammer befestigt und in das Fläschchen überführt, sodass das Blattstück vertikal in dem Fläschchen stand. Durch die Metallklammer wurde das Blatt während der Messungen auf dem Magnetrührer kontinuierlich gedreht, was zum einen eine Ausbildung dicker Grenzschichten an den Blattoberflächen verhinderte und zum anderen dafür sorgte, dass photosynthetisch gebildeter Sauerstoff nicht als Gasblase am Blatt haften blieb. Zur Verhinderung von Lufteinschlüssen wurde mit einer Spritze etwas Medium nachgefüllt und das Glasfläschchen erneut luftdicht verschlossen. Danach wurde ein Projektor (Pradovit P300, Leica, Solms, Deutschland) als Lichtquelle eingeschaltet mit einer PAR von 140 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> auf Höhe des Blattstücks und für 30 min die Sauerstoffkonzentration gemessen. Anschließend wurde der Versuchsaufbau mit schwarzem Tuch abgedunkelt und für 15-30 min die Entwicklung der O2-Konzentration im Dunkeln gemessen.

Abschließend wurde die Blattfläche des eingesetzten Blattstücks bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.5.1.) und nach 48 h Trocknung bei 80 °C die Trockenmasse eingewogen. Für die Auswertung wurde jeweils die Steigung einer linearen Regression durch die Datenpunkte verwendet. Für den Leerwert wurde ein Bereich von etwa 5 min Messdauer ausgewählt, dieser wurde von den im Licht und im Dunkeln gemessenen Werten subtrahiert. Die Werte der Unterwasser-Netto-Photosynthese und Unterwasser-Dunkelatmung wurden jeweils in linearen Bereichen mit einer Messdauer von 10-20 min bestimmt und bezogen auf die

Blattfläche oder die Trockenmasse in den Einheiten  $\mu$ mol O<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> bzw.  $\mu$ mol O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> dargestellt.

## 2.3.4. Messung des Sauerstoffpartialdrucks im Wurzelaerenchym

Die Untersuchungen zum pO<sub>2</sub> in den Wurzeln wurden im Freshwater Biology Laboratory der Universität Kopenhagen unter Anleitung von Ole Pedersen durchgeführt.

#### 2.3.4.1. Untersuchung der Wurzelmorphologie

Es wurden Querschnitte von Adventivwurzeln beider Taxa angefertigt, um den radiären Wurzelaufbau einschätzen zu können und so die nötige Eindringtiefe der Mikrosensoren zu ermitteln. Dazu wurden Pflanzen aus einem vorherigen Experiment verwendet, die in hydroponischer Kultur für drei Wochen periodisch überflutet wurden. Es wurden junge Adventivwurzeln von etwa 15 cm Länge verwendet und jeweils an vier Positionen Querschnitte angefertigt: direkt am Wurzel-Spross-Übergang, 5 cm weiter, 10 cm weiter und 1 cm von der Wurzelspitze entfernt. Die Wurzelquerschnitte wurden im Lichtmikroskop untersucht und fotografiert. Anschließend wurden die Bilder mit dem Programm ImageJ (Version 1.48k, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ausgewertet und die Schichtdicken der unterschiedlichen Gewebe ausgemessen.

#### 2.3.4.2. Messung des Sauerstoffpartialdrucks

Die Messungen des pO<sub>2</sub> im Aerenchym der Wurzeln wurden im Verlauf einer vollständigen Überflutung der Pflanze durchgeführt. Dabei wurden drei Zustände untersucht: Spross und Blätter an der Luft sowie Spross und Blätter vollständig überflutet im Dunkeln und im Licht. Die Messungen erfolgten mit O<sub>2</sub>-Mikrosensoren mit einem Spitzendurchmesser von 10 µm (OX10, Unisense, Aarhus, Dänemark). Die Mikrosensoren sind wie eine Clark-Elektrode aufgebaut und waren mit einem Multimeter (Microsensor Multimeter, Unisense) verbunden, das an einen Computer angeschlossen war, auf dem das Programm SensorTrace basic (Unisense) ausgeführt wurde. Alle Messungen wurden in einem temperaturregulierten Raum im Temperaturbereich zwischen 17,8 und 21,0 °C durchgeführt.

Für die Versuchsdurchführung wurde ein horizontaler Aufbau nach Winkel et al. (2011) genutzt (Abbildung 5). Dabei wurden parallel zwei baugleiche Versuchsaufbauten mit zwei Mikroelektroden betrieben. Die Wurzeln und die Sprossbasis der Versuchspflanze lagen in einer horizontalen Wurzelkammer, die aus einer halbierten Plexiglasröhre mit einer Länge von 26 cm und einem Durchmesser von 7 cm bestand. Sprosse und Blätter ragten durch ein

Loch vollständig aus der Wurzelkammer heraus und der Wurzel-Spross-Übergang wurde mit wiederablösbarer Klebemasse (Tack-It, Faber-Castell, Stein, Deutschland) abgedichtet. Die Wurzelkammer stand in einer größeren Überflutungskammer, in der eine vollständige Überflutung der oberirdischen Pflanzenteile möglich war. Wurzel- und Überflutungskammer wurden am Grund mit wiederablösbarer Klebemasse fixiert, um auch kleinere Bewegungen im Versuchsaufbau zu verhindern. Die zu untersuchende Adventivwurzel der Pflanze war mit Gummibändern an einem Metallgitter befestigt, das mit wiederablösbarer Klebemasse etwa 1 cm unterhalb des oberen Rands der Wurzelkammer fixiert wurde. Über der Wurzel wurde die Mikroelektrode an einem Mikromanipulator (MM5, Märzhäuser, Wetzlar, Deutschland) positioniert.

Vor jeder Messung wurden die Mikroelektroden bei 0 % air sat. und 100 % air sat. kalibriert. Zuvor wurden die Elektroden solange polarisiert bis ein stabiles Signal erreicht wurde. Die 0 % air sat. Kalibrierung erfolgte bei 20 °C in einer 0,1 M NaOH und 0,1 M Ascorbat-Lösung. Nach Erreichen eines stabilen Signals wurde der Wert in SensorTrace basic gespeichert, die Elektrode in destilliertem Wasser gespült und die 100 % air sat. Messung in destilliertem Wasser, das 10 min mit Umgebungsluft durchlüftet wurde, durchgeführt.

Zur Temperaturkompensation des Messsignals wurde das Sauerstoffsignal der eingesetzten Mikroelektroden über den Temperaturbereich zwischen 17,6 und 23,7 °C bei konstanten 100 % air sat. aufgezeichnet. Anschließend wurde das O<sub>2</sub>-Signal gegen die Temperatur aufgetragen und über eine lineare Regression die Signalabweichung pro °C berechnet, mit der am Ende die Messdaten korrigiert wurden. Dazu wurde während der Messungen die Temperatur mit einem Thermosensor (TP-2000, Unisense), der im Medium in der Wurzelkammer platziert wurde, aufgezeichnet.

Für die Messungen wurden die Pflanzen morgens aus der Versuchsanlage entnommen und in den baugleichen Versuchsaufbauten immer parallel eine *D. wibeliana-* und eine *D. cespitosa-*Pflanze aus der gleichen experimentellen Variante (Überflutung oder Kontrolle) untersucht. Es wurde immer im Wurzelaerenchym einer jungen Adventivwurzel in 5 cm Abstand zum Wurzel-Spross-Übergang gemessen. Zunächst wurde die Wurzel auf dem Gitter positioniert und mit Gummibändern befestigt. Dann wurde die Pflanze mit den Wurzeln und der Sprossbasis in der Wurzelkammer platziert, das Loch, durch das Spross und Blätter herausragten, mit wiederablösbarer Klebemasse abgedichtet und das Gitter mit der Adventivwurzel mit der gleichen Klebemasse in der Wurzelkammer fixiert. Währenddessen wurden die Wurzeln regelmäßig mit destilliertem Wasser besprüht. Anschließend wurde die

Wurzelkammer in der Überflutungskammer platziert und die Mikroelektrode mit Hilfe des Mikromanipulators im Aerenchym der Wurzel platziert. Dazu wurde die Position der Spitze des Mikrosensors mit einem Stereomikroskop überprüft und so mittig über der Wurzel platziert, dass die Spitze die Wurzeloberfläche berührt. Dann wurde die Mikroelektrode 100-200 µm in die Wurzel inseriert, bis das im Gewebe zunächst abfallende Sauerstoffsignal wieder anstieg, was ein Zeichen für das Erreichen des gasgefüllten Aerenchyms ist. Anschließend wurde der Temperatursensor in der Wurzelkammer platziert und deoxigeniertes Überflutungsmedium (pH 7,8; Smart & Barko, 1985; + 0,1 % (w/v) Agar; siehe Tabelle 1), das zuvor 15 min mit N<sub>2</sub> durchlüftet wurde, über einen Schlauch in die Kammer gefüllt, sodass diese bis zum Rand voll war. In einer zweiten Messreihe wurde die Wurzelkammer außerdem mit Glasplatten bedeckt, um Sauerstoffeintrag aus der Luft zu verhindern (siehe Abbildung 5). Dann wurden Spross und Blätter mit schwarzem Tuch abgedunkelt und es wurde abgewartet bis das Signal auf einen Minimalwert abgesunken war. Anschließend wurden Spross und Blätter vollständig mit artifiziellem Überflutungsmedium bei einem pO<sub>2</sub> von 100 % air sat. (pH 7,8; Smart & Barko, 1985; siehe Tabelle 1) überflutet. Zur Vermeidung von Luftkontakt wurden die Blätter mit Plastikfolie bedeckt, danach wieder abgedunkelt und ein stabiles Signal abgewartet. In einer ersten Messreihe wurde nach Absinken des Signals auf ein weiteres Minimum das schwarze Tuch entfernt, eine  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> auf Blatthöhe) eingeschaltet und Halogenlampe (ca. 120 die Sauerstoffentwicklung für eine weitere Stunde aufgezeichnet. In der zweiten Messreihe wurden die Versuchspflanzen nach dem Überfluten in oberirdische und unterirdische Biomasse getrennt, bei 80 °C für 48 h getrocknet und die Trockenmasse gewogen.



Abbildung 5: Versuchsaufbau zur Messung des  $pO_2$  im Wurzelaerenchym. Die Wurzeln wurden in einer Wurzelkammer platziert, die in einer größeren Überflutungskammer stand. Die untersuchte Wurzel (in rot dargestellt) wurde mit Gummibändern auf einem Gitter fixiert und die Spitze einer O<sub>2</sub>-Mikroelektrode im Wurzelaerenchym im Abstand von 5 cm zum Wurzel-Spross-Übergang platziert. Die Wurzelkammer wurde mit deoxigeniertem Medium gefüllt und optional mit Glasplatten abgedeckt, um die O<sub>2</sub>-Diffusion aus der Luft ins Medium zu minimieren. Die Temperatur im Medium der Wurzelkammer wurde mit einem Temperatursensor aufgezeichnet. Der Spross ragte durch ein Loch aus der Wurzelkammer in die Überflutungskammer und der Wurzel-Spross-Übergang wurde mit Klebemasse abgedichtet. A: Messung bei nicht überflutetem Spross an der Luft; B: Messung bei vollständig überflutetem Spross. Das Überflutungsmedium in der Überflutungskammer wurde maximal bis zur Oberkante der Wurzelkammer eingefüllt, um einen Austausch zwischen beiden Kammern zu vermeiden.

## 2.3.5. Untersuchung der Blattmorphologie

#### 2.3.5.1. Bestimmung der Blattfläche

Die Blattflächenbestimmung erfolgte durch Scannen der Blätter mit einem Flachbettscanner (HP PSC 2355, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) und anschließendes Umrechnen der Pixelanzahl in Blattflächen über eine zuvor erstellte Eichgerade. Für die Erstellung der Eichgeraden wurden pro Taxon jeweils 20 Blattteile aus dem mittleren Blattbereich mit einer Punktdichte von 300 dpi gescannt, anschließend manuell Länge und Breite gemessen und daraus die Blattfläche berechnet. Die Pixelanzahl der gescannten Blattteile wurde mit der Software Corel Photo-Paint X4 (Corel, Ottawa, Ontario, Kanada) bestimmt. Dazu wurde der Kontrast der Scan-Bilder so verändert, dass die Blattteile schwarz und der Hintergrund weiß erschienen. Dadurch konnten die Blattstücke anschließend mit dem Werkzeug Zauberstab markiert werden und über die Funktion Histogramm die Pixelanzahl der einzelnen Blattteile grafisch gegen die berechneten Blattflächen aufgetragen und eine lineare Regression berechnet.

Zur Bestimmung der Blattflächen wurden die untersuchten Blattteile ebenfalls mit einer Punktdichte von 300 dpi gescannt und wie oben beschrieben deren Pixelanzahl bestimmt. Die aus der linearen Regression der Eichgeraden erhaltene Funktionsgleichung wurde dann für die Umrechnung der Pixelanzahl in die Blattfläche in der Einheit m<sup>2</sup> verwendet.

#### 2.3.5.2. Gasfilmdicke und Porosität

Die Porosität der Blätter und die Dicke des Gasfilms, der sich beim Untertauchen unter Wasser auf der Blattoberfläche bildet, wurden mit Hilfe des archimedischen Prinzips bestimmt (Raskin & Kende, 1983). Die Auftriebskraft eines Körpers in einem Medium entspricht der Gewichtskraft des vom Körper verdrängten Mediums. Durch diese Annahme lassen sich das Volumen und die Dichte eines Körpers durch Wiegen des Körpers in Luft und in Wasser berechnen. Zur Bestimmung der Gasfilmdicke wurden die Blattteile außerdem mit und ohne Gasfilm unter Wasser gewogen. Die Porosität der Blätter, also der prozentuale Anteil gasgefüllten Interzellularräume, der wurde durch den Vergleich des Unterwassergewichts vor und nach Infiltrieren der Gasräume mit Wasser bestimmt.

Das Wiegen in der Luft und im Wasser wurde mit Hilfe einer Auftriebswaage durchgeführt. Dazu wurde eine Analysewaage (AW-423, Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit einem selbstgebauten Metallaufsatz versehen, sodass eine Blattprobe mit einer Metallklammer an den auf der Wägeplatte stehenden Metallaufsatz gehängt werden konnte. Die hängende Blattprobe konnte dann in einem mit destilliertem Wasser gefüllten Becherglas unter Wasser gewogen werden. Das Becherglas wurde mit einer Klemme an einem Stativ befestigt und so über der Wägeplatte platziert, dass kein Kontakt zu der Waage, dem Metallaufsatz oder der Blattprobe bestand. Bei allen Messungen unter Wasser wurde darauf geachtet, dass keine Luftbläschen an den Blattteilen oder den Metallklammern hafteten. Für eine schematische Darstellung der Auftriebswaage siehe Abbildung 6.



Abbildung 6: Schema der verwendeten Auftriebswaage zur Bestimmung der Gasfilmdicke und Blattporosität. Zum Wiegen der Blattproben unter Wasser wurde ein Becherglas mit destilliertem Wasser gefüllt und mit einem Stativ so über der Waage platziert, dass kein Kontakt zwischen Becherglas und Waage bestand. Zusätzlich wurde ein Metallaufsatz auf die Wägeplatte der Analysewaage gestellt, an den die Blattproben so gehängt wurden, dass diese vollständig unter Wasser hingen und dabei keinen Kontakt zum Becherglas hatten.

Für jede Messung wurden immer fünf bis sechs 5 cm lange Blattteile aus der Blattmitte verwendet. Vor dem Wiegen der Blattproben wurden diese zunächst gescannt, um anschließend die Blattfläche zu bestimmen (siehe Abschnitt 2.3.5.1.). Dann wurde sofort das Frischgewicht der Blattteile in der Luft ( $P_1$ ) gewogen. Anschließend wurden die Blattteile zusammen an zwei Metallklammern befestigt, an den Metallaufsatz der Auftriebswaage gehängt und das Blattgewicht inkl. der Klammern unter Wasser ( $P_2$ ) gewogen. Bei der ersten Messung unter Wasser verfügten die Blattteile über Gasfilme an der adaxialen Blattseite. Im nächsten Schritt wurde die Bildung der Gasfilme durch Entfernen der cuticulären

Wachsschicht verhindert. Dazu wurden beide Blattseiten aller Blattteile mit einem Pinsel mit 0,1 % Triton X-100 behandelt und anschließend in destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde das Blattgewicht ohne Gasfilm inkl. der Klammern unter Wasser ( $P_3$ ) gewogen. Außerdem wurde das Gewicht der Klammern ohne Blattproben unter Wasser ( $P_4$ ) bestimmt.

Zur Bestimmung der Porosität wurden die Blattteile dann in einen teilweise mit destilliertem Wasser gefüllten Exsikkator gegeben, sodass alle Blattteile vollständig mit Wasser bedeckt waren. Dann wurde mit einer Vakuumpumpe (N022 AN.18, Kroll, Hamburg, Deutschland) zehnmal für je 1 min ein Unterdruck erzeugt, der für eine Infiltration der gasgefüllten Interzellularräume mit Wasser sorgte, sodass bei einem erneuten Wiegen der Blätter unter Wasser keine Auftriebskraft mehr aus den Gasräumen in den Blättern resultierte.

Für die Berechnung der Gasfilmdicke wurden die Gleichungen nach Raskin und Kende (1983) zur Berechnung des Volumens der Gasfilme ( $V_{Luft}$ ) verwendet und dieses dann auf die gemessene Blattfläche der eingesetzten Blattteile bezogen. Dabei wurde zunächst die Auftriebskraft *B* (engl. buoyant force) des Gasvolumens berechnet:

$$B = P_3 - P_2 \tag{7}$$

P<sub>2</sub>: Blattgewicht mit Gasfilm inkl. der Klammern unter Wasser

P<sub>3</sub>: Blattgewicht ohne Gasfilm inkl. der Klammern unter Wasser

Anschließend wurde B durch die Dichte des Wassers ( $pH_2O$ ) bei 20 °C dividiert:

$$V_{Luft} = \frac{B}{pH_2O} \tag{8}$$

Durch Division des Volumens durch die eingesetzte Blattfläche wurde dann die durchschnittliche Dicke des Gasfilms erhalten (Winkel et al., 2011).

Für die Berechnung der Blattporosität wurden die für Wurzelporosität aufgestellten Gleichungen nach Thomson et al. (1990) auf Blätter angewendet. Dabei wurden zunächst die Volumina der eingesetzten Blattteile ( $V_{Blatt}$ ) und der gasgefüllten Räume im Blattgewebe ( $V_{Gas}$ ) berechnet:

$$V_{Blatt} = \frac{(Blattgewicht in der Luft) - (Blattgewicht im Wasser)}{Dichte des Wassers}$$
(9)

$$V_{Gas} = \frac{\binom{Blattgewicht im Wasser}{nach Vakuuminfiltration} - (Blattgewicht im Wasser)}{Dichte des Wassers}$$
(10)

Anschließend wurden beide Volumina in Beziehung gesetzt, um den prozentualen Anteil der Gasräume im Blattgewebe zu erhalten:

$$\% Porosit \ddot{a}t = \frac{V_{Gas} * 100}{V_{Blatt}}$$
(11)

#### 2.3.5.3. Spezifische Blattfläche

Die spezifische Blattfläche (SLA, engl. specific leaf area) wurde durch die Division der Blattfläche durch die Trockenmasse berechnet und in m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> angegeben. Die Bestimmung der Blattfläche erfolgte wie im Abschnitt 2.3.5.1. beschrieben. Nach dem Scannen der Blattteile wurden diese für mindestens 48 h bei 80 °C getrocknet und anschließend auf einer Analysewaage (AW-423, Sartorius, Göttingen, Deutschland) die Trockenmasse gewogen.

#### 2.3.5.4. Blatthydrophobizität

Die Hydrophobizität der Blattoberfläche wurde durch Messen des Kontaktwinkels  $\theta$  eines 5 mm<sup>3</sup> Wassertropfens auf der Oberfläche gemessen (Adam, 1963; siehe Abbildung 7). Nach Crisp (1963) können Blattoberflächen mit einem Kontaktwinkel  $\theta < 110^{\circ}$  als benetzbar und Oberflächen mit  $\theta > 130^{\circ}$  als nicht benetzbar angesehen werden. Für die Messung wurde das Blatt mit zwei Gummibändern in horizontaler Ausrichtung auf einem Styroporblock fixiert und ein 5 mm<sup>3</sup> Tropfen destillierten Wassers auf die Oberfläche appliziert. Anschließend wurde der Wassertropfen durch ein horizontal aufgebautes Stereomikroskop fotografiert und der Kontaktwinkel  $\theta$  in dem Programm ImageJ (Version 1.48k, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) ausgemessen. Bei allen Blättern wurden sowohl die adaxiale als auch die abaxiale Seite untersucht.



Abbildung 7: Schematische Darstellung der Messung des Kontaktwinkels  $\theta$  eines 5 mm<sup>3</sup> Wassertropfens auf der Blattoberfläche. Dazu wurde der Winkel einer Tangenten zum Wassertropfen durch den Kontaktpunkt zwischen Wassertropfen und Blattoberfläche gemessen. Je höher der Winkel  $\theta$ , desto höher die Hydrophobizität der Oberfläche. A: großer Kontaktwinkel = hohe Blatthydrophobizität; B: kleiner Kontaktwinkel = geringe Blatthydrophobizität. Darstellung verändert nach Brewer et al. (1991).

#### 2.3.5.5. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Zur Anfertigung der Blattquerschnitte wurden die Proben in LR-White eingebettet und mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert, Wien, Österreich) geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht.

Für die Einbettung wurden die Blattproben zunächst in 2 % Paraformaldehyd (PFA) in einem 50 mM MSB-Puffer (pH 6,8) fixiert, anschließend dreimal mit 50 mM MSB-Puffer gewaschen und mit Ethanol bei 4 °C auf Eis entwässert. Danach wurden die Proben mit LR-White infiltriert und in Gelatinekapseln eingebettet. Die Polymerisation des LR-White Einbettungsmediums erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur und abschließend für 36 h bei 50 °C. Am Ultramikrotom wurden dann 1 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Toluidinblau angefärbt. Am Lichtmikroskop (Zeiss Axioskop, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland) wurden die Querschnitte untersucht und für die anschließende Auswertung mit einer angeschlossenen Kamera (AxioCam MRc5, Carl Zeiss Microscopy) in Verbindung mit dem Programm AxioVision (Version 4.6, Carl Zeiss Microscopy) fotografiert.

Mit dem Programm ImageJ (Version 1.48k, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) erfolgte die Auswertung der Bilder. Es wurden die Blattdicke, die Blattbreite, die Anzahl adaxialer Epidermiszellen im Querschnitt und das Verhältnis von Oberfläche/Volumen gemessen. Für die Blattdicke wurde die Höhe in der Mitte aller Blattrippen gemessen und der Mittelwert gebildet. Die Blattbreite wurde durch Ausmessen der Länge der flachen abaxialen Blattseite im Querschnitt ermittelt.

## 2.3.6. Bestimmung der Deckung oberirdischer Biomasse

Die Deckung wurde als indirektes Maß der Biomasse bestimmt. Dazu wurden die untersuchten Pflanzen in der Aufsicht aus etwa 1 m Höhe fotografiert und mit dem Programm ImageJ (Version 1.48k, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) die Flächen bestimmt, die von grünen Blattteilen der Versuchspflanzen abgedeckt wurden. Über die Funktion "Threshold" (Farbraum YUV; Y: 0-255, U: 60-111, V: 90-125) wurden die grünen Blattteile markiert und die Pixelanzahl der markierten Fläche gemessen. Die Umrechnung der Pixelanzahl erfolgte über die Ausmessung der ebenfalls auf den Bildern sichtbaren Töpfe der Pflanzen. Die bekannte reale Fläche des Topfes von 121 cm<sup>2</sup> wurde durch die in ImageJ bestimmte Pixelanzahl der grünen Blattteile multipliziert, um so die Deckung grüner Blattteile in cm<sup>2</sup> zu erhalten. Durch die Umrechnung von Pixelanzahl in cm<sup>2</sup> über die Topffläche auf demselben Foto wurden außerdem leichte Unterschiede der Fotografierhöhen herausgerechnet.

## 2.3.7. Quantifizierung von Pilzbefall

Zur Quantifizierung des Pilzbefalls der Blätter wurden bei allen untersuchten Pflanzen befallene und nicht befallene Blätter ausgezählt und die Pflanzen nach dem prozentualen Anteil befallener Blätter in vier Kategorien eingeteilt (Tabelle 2).

Kategorie	Anteil befallener Blätter (%)
1	0-25
2	26-50
3	51-75
4	76-100

Tabelle 2: Kategorien des Pilzbefalls zurEinteilung untersuchter Pflanzen nachprozentualem Befall der Blätter

## 2.3.8. Statistik

Alle statistischen Auswertungen erfolgten in der Software Statistica (Version 10, StatSoft. Inc., Tulsa, OK, USA) und es wurde stets ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Im Großteil der statistischen Vergleiche wurde die multifaktorielle ANOVA berechnet, um Effekte der Faktoren Taxon und Behandlung sowie in einigen Fällen auch der Zeit auf die untersuchten Parameter zu berechnen. Auf diese Weise wurden die Effekte auf die ADH-Aktivität, die Parameter der Blattmorphologie, die Unterwasser-Photosynthese und Dunkelatmung, die Chlorophyllfluoreszenzparameter und die Biomasse-Allokation untersucht. Zum multiplen Gruppenvergleich wurde anschließend ein Tukey HSD *post hoc* Test berechnet. Wenn die Daten nicht der Voraussetzung der Normalverteilung entsprachen, wurde vor der Berechnung der ANOVA eine log-Transformation oder Box-Cox-Transformation durchgeführt.

Da bei den Daten des  $pO_2$  und des  $\Phi_{PSII}$  keine Homoskedastizität vorlag, wurde für diese Parameter der Scheirer-Ray-Hare Test eingesetzt, der das nicht-parametrische Äquivalent der zweifaktoriellen ANOVA ist. Beim Scheirer-Ray-Hare Test wird eine zweifaktorielle ANOVA mit den Rangwerten berechnet. Er stellt somit eine Erweiterung des Kruskal-Wallis Tests dar (Dytham, 2011).

Außerdem wurden für Vergleiche zweier Mittelwerte t-Tests für unabhängige Stichproben berechnet. So wurden  $\text{ETR}_{\text{max}}$ ,  $E_k$ ,  $\alpha$  und die Deckung am Standort Kollmar zwischen beiden Taxa und die ADH-Aktivitäten zwischen verpflanzten und unbeeinflussten Pflanzen im Freiland verglichen. Für den Pilzbefall im Krempermoor, der in Kategorien dokumentiert wurde, erfolgte ein Mittelwertsvergleich zwischen beiden Taxa mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test. Um einen Zusammenhang zwischen Überflutungsdauer und ADH-Aktivität im Freiland nachzuweisen, wurde eine lineare Regression zwischen wöchentlicher Gesamtüberflutungsdauer und ADH-Aktivität berechnet.

# 3. Ergebnisse

# 3.1. Erste Experimente zur physiologischen Reaktion auf Überflutung unter kontrollierten Bedingungen

#### 3.1.1. Alkoholdehydrogenase in Blättern

Im Verlauf eines fünfstündigen initialen Überflutungsereignisses wurde bei beiden Taxa weder nach 2 h noch nach 4 h ein Anstieg der ADH-Enzymaktivität in den Blättern nachgewiesen (Abbildung 8). Zwei Stunden nach Beenden der Überflutung steigt die Aktivität nur in den Blättern der überfluteten *D. cespitosa*-Pflanzen an (Zeitpunkt 7 h in Abbildung 8), dieser Anstieg ist jedoch nicht statistisch signifikant, da es weder einen signifikanten Effekt für den Faktor "Taxon" (ANOVA; n = 3; F = 0,81; p = 0,39) noch für den Faktor "Behandlung" gibt (ANOVA; n = 3; F = 1,67; p = 0,23). Bei den überfluteten *D. wibeliana*-Pflanzen und den Kontrollpflanzen beider Taxa gibt es nur geringfügige Schwankungen im Verlauf des Experiments (Abbildung 8).



Abbildung 8: ADH-Enzymaktivität in Blättern bezogen auf lösliches Gesamtprotein im Verlauf eines erstmaligen (initialen) Überflutungsereignisses in einer Klimakammer. Pflanzen der Variante Überflutung wurden für 5 h vollständig überflutet und vor der Überflutung (0 h), nach 2 h sowie 4 h Überflutung und nach 7 h (2 h nach Ende der Überflutung) die ADH-Aktivität in den Blättern gemessen. Kontrollmessungen wurden in genetisch korrespondierenden nicht überfluteten Pflanzen durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 3).

## Ergebnisse

Im Verlauf von drei Wochen periodischer Überflutung ist bereits nach einer Woche ein deutlicher Anstieg der ADH-Aktivität in den Blättern periodisch überfluteter Pflanzen beider Taxa messbar (Abbildung 9). Die Werte liegen mit 7,6 und 7,9 nkat mg<sup>-1</sup> bei *D. cespitosa* und *D. wibeliana* in den überfluteten Pflanzen um mehr als das Zweifache höher als die Kontrollpflanzen mit 2,1 und 3,3 nkat mg<sup>-1</sup>. Nach zwei Wochen steigt die ADH-Aktivität bei periodisch überfluteten *D. wibeliana*-Pflanzen auf 10,7 nkat mg<sup>-1</sup> an, während es bei *D. cespitosa* und den Kontrollpflanzen beider Taxa keine Veränderungen gibt (Abbildung 9). Nach drei Wochen periodischer Überflutung gibt es in keiner der Varianten eine deutliche Veränderung der ADH-Aktivität im Vergleich zur Vorwoche (Abbildung 9).



Abbildung 9: ADH-Enzymaktivität in Blättern bezogen auf lösliches Gesamtprotein im Verlauf von drei Wochen periodisch wiederkehrender Überflutung in einer Klimakammer. Proben der periodisch überfluteten Pflanzen wurden stets unter Wasser zum Zeitpunkt C (siehe "Experimentelles Design" im Abschnitt 2.2.1.) genommen. Zeitgleich wurden Proben genetisch korrespondierender nicht überfluteter Kontrollpflanzen genommen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts, n = 3 (1. Woche), n = 4 (2. Woche), n = 17 (3. Woche).

## Ergebnisse

Die Ergebnisse der ANOVA zeigen, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den ADH-Aktivitäten vor und während der Überflutungsphase gibt (Faktor "Zeitpunkt"; n = 17; F = 0,50; p = 0,48). Auch gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Taxa (Faktor "Taxon"; n = 17; F = 2,41; p = 0,13). Der Effekt der periodischen Überflutung ist hingegen hochsignifikant (Faktor "Behandlung"; n = 17; F = 185,5; p < 0,001). Es gibt aber eine nahezu signifikante Interaktion zwischen den Faktoren "Taxon" und "Behandlung" (n = 17; F = 3,45; p = 0,068). Ein *post hoc* Test (Tukey HSD) zeigt außerdem, dass alle periodisch überfluteten Pflanzen an beiden Zeitpunkten signifikant höhere ADH-Aktivitäten aufweisen als alle Kontrollgruppen. Innerhalb der periodisch überfluteten Pflanzen gibt es hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Taxa oder den Zeitpunkten.

Die ADH-Proteinmenge nach dreiwöchiger periodischer Überflutung spiegelt das Muster der Enzymaktivität wider. Während in den Blättern der Kontrollpflanzen beider Taxa nur sehr schwache ADH-Proteinbanden nachzuweisen sind, zeigt sich an beiden Zeitpunkten in den periodisch überfluteten Pflanzen eine deutlich erhöhte Proteinmenge (*Western Blot* Detektion in Abbildung 10). Außerdem ist die ADH-Proteinmenge tendenziell bei *D. wibeliana* höher als bei *D. cespitosa*.

Bei der Genexpression zeigt sich ein deutlicherer Unterschied zwischen den Taxa mit stärkeren Banden bei *D. wibeliana*, sowohl in periodisch überfluteten Pflanzen als auch in den Kontrollpflanzen (*Northern Blot* Detektion in Abbildung 10). Es scheint nach drei Wochen periodischer Überflutung allerdings keine Induktion der ADH-Genexpression durch ein einzelnes Überflutungsereignis mehr zu geben, da die Genexpression bei keinem der beiden Taxa während der Überflutung (Zeitpunkt C; 4 h) im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Überflutung (A; 0 h) erhöht ist (Abbildung 10).



Abbildung 10: *Adh1*-Genexpression, ADH-Proteinmenge und –Enzymaktivität in Blättern nach drei Wochen periodisch wiederkehrender Überflutung in einer Klimakammer. Überflutete Pflanzen wurden zweimal täglich fünfstündig überflutet, Kontrollpflanzen waren keiner Überflutung ausgesetzt. Blattproben wurden an zwei Zeitpunkten genommen: alle Pflanzen an der Luft (Zeitpunkt A, 0 h), periodisch überflutete Pflanzen unter Wasser (Zeitpunkt C, 4 h, siehe auch "Experimentelles Design" im Abschnitt 2.2.1.). Die *Northern-Blot*-Detektion wurde von Ambroselli (2013) durchgeführt. Bei der Proteinmenge ist eine typische *Western-Blot*-Detektion von drei Experimenten abgebildet, RbcL wurde auf denselben Membranen detektiert und dient als Beladungskontrolle. Bei der Enzymaktivität sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts dargestellt (n = 17).

## 3.1.2. Photosynthese-Effektivität in Reaktion auf periodische Überflutung

Vor Beginn der periodischen Überflutung weist *D. wibeliana* etwas niedrigere Werte auf als *D. cespitosa* (Zeitpunkt 0; Abbildung 11). Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant (ANOVA; Tukey-HSD *post hoc* Test; n = 4). Nach zwei Wochen ist der  $F_v/F_m$  bei *D. cespitosa* in beiden Behandlungen leicht angestiegen, während bei *D. wibeliana* nur die periodisch überfluteten Pflanzen einen Anstieg des  $F_v/F_m$  aufweisen. Nach vier Wochen liegen die Werte aller Pflanzen auf gleicher Höhe (Abbildung 11). Über den gesamten Verlauf gibt es einen signifikanten Taxon-Effekt (ANOVA; n = 4; F = 5,75; p = 0,034), da die Werte von *D. wibeliana* bei den ersten beiden Zeitpunkten im Vergleich zu *D. cespitosa* niedriger sind. Außerdem ist der Effekt der Zeit signifikant (ANOVA; n = 4; F = 7,46; p = 0,0030), da die Werte insbesondere bei *D. wibeliana* im Verlauf der vier Wochen ansteigen.



Abbildung 11: Maximale Quantenausbeute des Photosystem II ( $F_v/F_m$ ) im Verlauf von vier Wochen periodisch wiederkehrender Überflutung in einer Klimakammer. Überflutete Pflanzen wurden zweimal täglich fünfstündig überflutet, Kontrollpflanzen waren keiner Überflutung ausgesetzt. Der  $F_v/F_m$ -Wert wurde an drei Zeitpunkten gemessen: zu Beginn des Experiments (0 Wochen), nach zwei Wochen und nach vier Wochen. Messungen erfolgten morgens vor Beginn der Lichtperiode. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).

# 3.2. Reziprokes Verpflanzungsexperiment im Freiland

## 3.2.1. Überflutungsregime und Temperatur in Kollmar

Die Überflutungsdauer schwankt in den sechs Wochen zwischen 0 h und 6,9 h, wobei die Pflanzen bei insgesamt fünf Überflutungsereignissen nicht vollständig überflutet wurden (0 h Überflutungsdauer; Abbildung 12). Im Mittel wurden die Pflanzen zweimal täglich für jeweils 3,1 h überflutet.

Die maximale Überflutungshöhe folgt im Verlauf der sechs Wochen im Wesentlichen dem Muster der Überflutungsdauer und schwankt zwischen 16,8 cm und 169 cm (Abbildung 12). Im Mittel liegt die maximale Überflutungshöhe bei 80,9 cm. Sowohl Überflutungsdauer als auch Überflutungshöhe nehmen im Verlauf der sechs Wochen zu und liegen insbesondere in der ersten Woche deutlich niedriger als in der sechsten Woche (Abbildung 12).



Abbildung 12: Überflutungsdauer und maximale Überflutungshöhe im Verlauf der ersten sechs Wochen des reziproken Verpflanzungsexperiments am Standort Kollmar. Für die Überflutungsdauer wurden nur Zeiten mit Überflutungshöhen > 30 cm über der Geländeoberfläche einbezogen, um nur Zeiten vollständiger Überflutung der Pflanzen zu berücksichtigen. Dargestellt sind Überflutungsdauer und –höhe der einzelnen Überflutungsereignisse (ca. zwei pro Tag). Die Aufzeichnung erfolgte vom 09.08.2012 – 20.09.2012.

Die Lufttemperatur schwankt in den sechs Wochen zwischen 7,0 °C und 31,1 °C (Abbildung 13). Die mittlere Tageshöchsttemperatur liegt bei 21,6 °C und die mittlere Tagestiefsttemperatur bei 13,2 °C.



Abbildung 13: Tageshöchst- und Tagestiefsttemperatur im Verlauf der ersten sechs Wochen des reziproken Verpflanzungsexperiments am Standort Kollmar. Messungen erfolgten in ca. 2 m Höhe über der Geländeoberfläche. Die Aufzeichnung erfolgte vom 09.08.2012 – 20.09.2012.

#### 3.2.2. Entwicklung der reziprok verpflanzten Individuen im Freiland

In Kollmar zeigt sich, dass die Blätter von *D. cespitosa* bereits nach einer Woche beginnen abzusterben (Abbildung 14). Diese Entwicklung setzt sich auch nach zwei und drei Wochen fort. Jedoch beginnen sich nach drei Wochen bereits neue Blätter zu bilden, die nach sechs Wochen weiter gewachsen sind. Die alten Blätter von *D. cespitosa* sind nach sechs Wochen vollständig abgestorben, während *D. wibeliana* in Kollmar äußerlich keine starken Veränderungen zeigt (Abbildung 14).



Abbildung 14: Beispielhafte Entwicklung der verpflanzten Individuen von Deschampsia cespitosa (D. ces) und Deschampsia wibeliana (D. wib) am Standort Kollmar im Verlauf von neun Monaten. Kollmar ist ein natürlicher Standort von D. wibeliana und durch tidebedingte periodische Überflutung gekennzeichnet. Die verpflanzten Individuen wurden zuvor ohne Überflutung eine Woche im Freien kultiviert. Der Versuch wurde von August 2012 bis Mai 2013 durchgeführt.

## Ergebnisse

Nach neun Monaten haben beide Taxa sowohl im natürlichen Habitat als auch am Standort des Schwestertaxons überlebt. Jedoch zeigt sich an beiden Standorten eine höhere Biomasse des jeweils einheimischen Taxons: in Kollmar weist *D. wibeliana* ein höhere Biomasse auf und im Krempermoor *D. cespitosa* (Abbildung 15). Dies sind jedoch nur optische Eindrücke, da die Biomasse nicht bestimmt wurde. Eine Annäherung an die Biomasse beider Taxa nach neun Monaten in Kollmar soll die Deckung der grünen Pflanzenteile ermöglichen, die in Kapitel 3.2.7. beschrieben wird.



Abbildung 15: Beispielhaftes äußeres Erscheinungsbild der reziprok verpflanzten Individuen von *Deschampsia cespitosa (D. ces)* und *Deschampsia wibeliana (D. wib)* nach neun Monaten im Freiland. Kollmar ist ein natürlicher Standort von *D. wibeliana* und durch tidebedingte periodische Überflutung gekennzeichnet, während die Pflanzen am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor keiner vollständigen Überflutung ausgesetzt waren. Die verpflanzten Individuen wurden zuvor ohne Überflutung eine Woche im Freien kultiviert. Der Versuch wurde von August 2012 bis Mai 2013 durchgeführt.

#### 3.2.3. ADH-Aktivität in Blättern reziprok verpflanzter Individuen

Bei den nicht überfluteten Pflanzen im Krempermoor zeigt *D. wibeliana* nach einer Woche eine hohe ADH-Aktivität von 12,1 nkat mg<sup>-1</sup>, die nach zwei Wochen auf 10,6 nkat mg<sup>-1</sup> und nach drei Wochen auf 3,7 nkat mg<sup>-1</sup> absinkt (Abbildung 16). Nach vier und sechs Wochen bleiben die Werte auf einem niedrigen Niveau. Bei *D. cespitosa* liegt der Wert mit 6,7 nkat mg<sup>-1</sup> im Krempermoor schon nach einer Woche deutlich niedriger und sinkt im Verlauf noch weiter ab.

In den periodisch überfluteten Pflanzen in Kollmar liegen die Werte bei beiden Taxa zu allen Zeitpunkten deutlich höher als im Krempermoor (Abbildung 16). Nach einer Woche weist *D. cespitosa* mit 27,6 nkat mg<sup>-1</sup> eine deutlich höhere ADH-Aktivität auf als *D. wibeliana* mit 17,1 nkat mg<sup>-1</sup>. Im Verlauf der sechs Wochen sinken die Werte bei *D. cespitosa* ab, während sie bei *D. wibeliana* ansteigen. Die größte Veränderung findet dabei zwischen vier und sechs Wochen statt. Nach vier Wochen liegen die Werte beider Taxa in Kollmar gleichauf bei etwa 22 nkat mg<sup>-1</sup>. Nach sechs Wochen hingegen sinken die Werte bei *D. cespitosa* auf 12,3 nkat mg<sup>-1</sup> und steigen bei *D. wibeliana* auf 32,6 nkat mg<sup>-1</sup>. Dieser Unterschied nach sechs Wochen in Kollmar ist statistisch signifikant (ANOVA; Tukey HSD *post hoc* Test; n = 6; p < 0,001).

Die Ergebnisse der ANOVA zeigen eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren "Taxon", "Standort" und "Zeit" (n = 6; F = 7,26; p < 0,001). Das ist dadurch zu erklären, dass sich die ADH-Aktivität sowohl zwischen beiden Taxa als auch zwischen den Versuchsstandorten über die Zeit unterschiedlich verändert. So sinken die Werte bei *D. cespitosa* in Kollmar, während sie bei *D. wibeliana* steigen. Im Krempermoor sinken die Werte dagegen bei beiden Taxa, besonders stark bei *D. wibeliana* (Abbildung 16).



Abbildung 16: ADH-Aktivität bezogen auf eingesetztes Gesamtprotein in den Blättern reziprok verpflanzter Pflanzen im Verlauf von sechs Wochen. Kollmar ist der natürliche Standort von *D. wibeliana*, der durch tideabhängige periodische Überflutung gekennzeichnet ist. Krempermoor ist der natürliche *D. cespitosa*-Standort, an dem die Pflanzen keiner Überflutung ausgesetzt waren. Vor der Verpflanzung wurden alle Pflanzen eine Woche ohne Überflutung im Freien kultiviert. Dargestellt sind Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts (n = 6).
Trägt man die ADH-Aktivität der periodisch überfluteten Pflanzen von Woche zwei bis sechs gegen die Gesamtüberflutungsdauer der jeweiligen Woche auf, ist festzustellen, dass die ADH-Aktivität in den Blättern von *D. wibeliana* mit zunehmender Überflutungsdauer ansteigt (Abbildung 17 B). Bei *D. cespitosa* gibt es nur einen leichten Anstieg von der zweiten bis zur vierten Woche (Überflutungsdauer 40-50 h/Woche in Abbildung 17 A), während die ADH-Aktivität bei *D. cespitosa* in der sechsten Woche stark sinkt, obwohl dort die Überflutungsdauer am höchsten ist (Überflutungsdauer 62 h/Woche in Abbildung 17 A). Daher weisen die Ergebnisse einer linearen Regression bei *D. cespitosa* für diesen Zeitraum auf einen negativen Zusammenhang hin, der jedoch nicht signifikant ist (R = -0,634; korr.  $R^2 = 0,103$ ; F = 1,35; p = 0,366). Dagegen wurde bei *D. wibeliana* von Woche zwei bis sechs ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen wöchentlicher Gesamtüberflutungsdauer und ADH-Aktivität nachgewiesen (R = 0,993; korr.  $R^2 = 0,978$ ; F = 132,2; p = 0,0075).



Abbildung 17: ADH-Aktivität bezogen auf eingesetztes Gesamtprotein in den Blättern periodisch überfluteter Pflanzen im Freiland in Abhängigkeit von der wöchentlichen Überflutungsdauer. A: Eine lineare Regression durch die Punkte weist für *D. cespitosa* auf einen negativen, aber nicht signifikanten Zusammenhang hin (R = -0,634; korr. R<sup>2</sup> = 0,103; F = 1,35; p = 0,366). B: Bei *D. wibeliana* wurde in der linearen Regression ein signifikanter positiver Zusammenhang nachgewiesen (R = 0,993; korr. R<sup>2</sup> = 0,978; F = 132,2; p = 0,0075). Bei der ADH-Aktivität sind Mittelwerte und der Standardfehler des Mittelwerts dargestellt (n = 6).

Vergleicht man verpflanzte und unbeeinflusste *D. cespitosa*-Pflanzen im Krempermoor, sieht man nur geringe Unterschiede mit ADH-Aktivitäten von 4,7 bzw. 6,5 nkat mg<sup>-1</sup> (Abbildung 18). Dieser Unterschied ist nicht signifikant (T-test; n = 6; t-Wert = 0,90; p = 0,39). Beide Werte liegen deutlich niedriger als die der periodisch überfluteten *D. cespitosa*-Pflanzen im Krempermoor mit 22,3 nkat mg<sup>-1</sup>. Der Vergleich zwischen verpflanzten und unbeeinflussten *D. wibeliana*-Pflanzen am Standort Kollmar zeigt hingegen einen signifikanten Unterschied (T-test; n = 6; t-Wert = 3,55; p = 0,0053). Unbeeinflusste Pflanzen weisen mit 14,6 nkat mg<sup>-1</sup> eine signifikant niedrigere ADH-Aktivität auf als verpflanzte Individuen mit 21,9 nkat mg<sup>-1</sup> (Abbildung 18). Beide Werte liegen jedoch deutlich überfluteten *D. wibeliana*-Pflanzen im Krempermoor (2,5 nkat mg<sup>-1</sup>).



Abbildung 18: ADH-Aktivität bezogen auf eingesetztes Gesamtprotein in Blättern verpflanzter und unbeeinflusster Pflanzen im Freiland vier Wochen nach der Verpflanzung. ADH-Aktivitäten wurden in Blättern verpflanzter Individuen bei beiden Taxa an beiden Standorten gemessen. Unbeeinflusste *D. cespitosa*-Pflanzen wurden am Standort Krempermoor und unbeeinflusste *D. wibeliana*-Pflanzen am Standort Kollmar untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 6).

# 3.2.4. Photosynthese-Effektivität und Lichtsättigungseigenschaften beider Taxa nach reziproker Verpflanzung im Freiland

Sowohl die ETR<sub>max</sub> als auch der E<sub>k</sub> liegen bei *D. wibeliana* niedriger als bei *D. cespitosa* (Abbildung 19 A & B). Beide Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant (T-Test; ETR<sub>max</sub>: t-Wert = 1,65; p = 0,174; E<sub>k</sub>: t-Wert = 1,49; p = 0,212). Die initiale Steigung  $\alpha$  liegt hingegen bei *D. cespitosa* tendenziell niedriger als bei *D. wibeliana* (Abbildung 19 C). Jedoch ist auch dieser Unterschied nicht signifikant (T-Test; t-Wert = 1,89; p = 0,132).



Abbildung 19: Ergebnisse der Lichtsättigungskurven zwei Wochen nach der Verpflanzung im Krempermoor. A: Maximale Elektronentransportrate (ETR<sub>max</sub>), B: Lichtsättigungspunkt ( $E_k$ ), C: Initiale Steigung ( $\alpha$ ). Messungen erfolgten parallel mit einem PAM-2000 und einem PAM-2100 Fluorometer. Alle Pflanzen waren zu Beginn der Messung lichtadaptiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 3).

Nach vier Wochen weist *D. wibeliana* bei den periodisch überfluteten Pflanzen in Kollmar mit 0,795 einen signifikant höheren  $F_v/F_m$ -Wert auf als *D. cespitosa* mit 0,767 (Abbildung 20; ANOVA; Tukey HSD *post hoc* Test; p = 0,0034). Der  $F_v/F_m$  der *D. wibeliana*-Pflanzen in Kollmar ist außerdem signifikant höher als der nicht überfluteter *D. wibeliana*-Pflanzen im Krempermoor (ANOVA; Tukey HSD *post hoc* Test; p < 0,001). Zusätzlich zeigen die Ergebnisse der ANOVA eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren "Taxon" und "Standort" (F = 17,17; p < 0,001), da der  $F_v/F_m$  in Kollmar bei *D. wibeliana* höher liegt und im Krempermoor bei *D. cespitosa* (Abbildung 20). Trotz statistisch signifikanter Unterschiede, sind die absoluten Unterschiede jedoch gering.



Abbildung 20: Maximale Quantenausbeute des PS II ( $F_v/F_m$ ) vier Wochen nach reziproker Verpflanzung im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Vor Beginn der Messung wurden alle Pflanzen 15 min dunkeladaptiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 15). Unterschiedliche Großbuchstaben weisen auf signifikante Unterschiede hin (ANOVA; Tukey HSD *post hoc* Test;  $\alpha = 0,01$ ).

Die Induktionskurven mit einer Lichtintensität aus dunkeladaptiertem Zustand heraus wurden an beiden Standorten im Freiland gemessen, um den Verlauf der Photosynthese-Effektivität zu dokumentieren. Dabei ist festzustellen, dass der  $F_v/F_m$  in allen vier Varianten nach drei Wochen am höchsten ist und im Verlauf des Verpflanzungsexperiments sinkt (Abbildung 21). Beide Taxa haben nach sechs Wochen höhere Werte an den heimischen Standorten (*D. wibeliana* in Kollmar und *D. cespitosa* im Krempermoor) und niedrigere im fremden Habitat. Während sich bei *D. wibeliana* im Krempermoor der  $F_v/F_m$ -Wert nach neun Monaten erholt und gleichauf mit *D. cespitosa* im Krempermoor liegt, bleibt er bei *D. cespitosa* in Kollmar auf niedrigerem Niveau (Abbildung 21).



Abbildung 21: Maximale Quantenausbeute des PS II  $(F_v/F_m)$  im Verlauf eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Vor Beginn der Messung wurden alle Pflanzen 15 min dunkeladaptiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 6).

Der höchste  $\Phi_{PSII}$ -Wert, der im Verlauf der Induktionskurve erreicht wurde, liegt nach drei Wochen bei beiden Taxa in periodisch überfluteten Pflanzen in Kollmar tendenziell niedriger als im Krempermoor (Abbildung 22). In Kollmar ändert sich der Wert bei *D. cespitosa* im Verlauf des Experiments nicht, während er bei *D. wibeliana* nach neun Monaten ansteigt und dann etwa gleichauf mit den Werten beider Taxa im Krempermoor liegt. Im Krempermoor fallen die Werte bei *D. cespitosa* im Verlauf ab, liegen aber durchgängig über denen in Kollmar. Bei *D. wibeliana* fällt der  $\Phi_{PSII}$  im Krempermoor nach sechs Wochen ab auf ein Niveau unterhalb der Werte in Kollmar, steigt nach neun Monaten aber wieder an (Abbildung 22).



Abbildung 22: Die höchsten  $\Phi_{PSII}$ -Werte, die während einer fünfminütigen Induktionskurve aus einem dunkeladaptierten Zustand zu einer konstanten PAR von 357 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> im Verlauf eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland erreicht wurden. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Messungen erfolgten nach drei und sechs Wochen sowie nach neun Monaten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 6).

Der  $\Phi_{\text{NPQ max}}$  ist nach drei Wochen bei den periodisch überfluteten *D. cespitosa*-Pflanzen in Kollmar am höchsten (Abbildung 23). Nach sechs Wochen steigt der Wert bei beiden Taxa im Krempermoor an, insbesondere bei *D. wibeliana*. Nach neun Monaten steigt der  $\Phi_{\text{NPQ max}}$ bei beiden Taxa in Kollmar stark an und außerdem bei *D. cespitosa* im Krempermoor, sodass zu diesem Zeitpunkt alle Varianten etwa gleichauf liegen. Jedoch steigt nur der im Verlauf der Induktionskurve maximal erreichte  $\Phi_{\text{NPQ}}$  ( $\Phi_{\text{NPQ max}}$ ) stark an, während der am Ende der Kurve erreichte Wert ( $\Phi_{\text{NPQ end}}$ ) nur geringfügig ansteigt (Abbildung 23).



Abbildung 23: Maximale ( $\Phi_{NPQ}$  max) und am Ende erreichte ( $\Phi_{NPQ}$  end)  $\Phi_{NPQ}$ -Werte während einer fünfminütigen Induktionskurve aus einem dunkeladaptierten Zustand zu einer konstanten PAR von 357 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> im Verlauf eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Messungen erfolgten nach drei und sechs Wochen sowie nach neun Monaten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 6).

Der  $\Phi_{NO}$ -Wert, der am Ende der Induktionskurve erreicht wurde ( $\Phi_{NO end}$ ), liegt nach drei Wochen an beiden Standorten bei *D. cespitosa* niedriger als bei *D. wibeliana* (Abbildung 24). Nach sechs Wochen steigen die Werte bei allen vier Varianten an, besonders stark jedoch bei den periodisch überfluteten *D. cespitosa*-Pflanzen in Kollmar, sodass diese einen deutlich höheren Wert als im Krempermoor aufweisen. Nach neun Monaten sinken die Werte in allen Varianten deutlich ab. *D. cespitosa* weist in Kollmar aber immer noch einen höheren  $\Phi_{NO}$  auf als die übrigen Varianten (Abbildung 24).



Abbildung 24: Im Verlauf eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland gemessene  $\Phi_{NO}$ -Werte, am Ende einer fünfminütigen Induktionskurve aus einem dunkeladaptierten Zustand zu einer konstanten PAR von 357 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Messungen erfolgten nach drei und sechs Wochen sowie nach neun Monaten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 6).

Der maximal erreichte qL-Wert ( $qL_{max}$ ) liegt nach drei Wochen bei beiden Taxa im Krempermoor höher als in Kollmar und an beiden Standorten jeweils bei *D. cespitosa* höher als bei *D. wibeliana* (Abbildung 25). Nach sechs Wochen zeigt sich weiterhin das gleiche Muster, nur dass die Unterschiede zwischen den Taxa im Krempermoor durch ein Absinken des  $qL_{max}$  bei *D. cespitosa* geringer sind. Nach neun Monaten steigen die Werte in allen vier Varianten an, besonders stark bei *D. wibeliana*. Bei den periodisch überfluteten Pflanzen in Kollmar liegen die Werte beider Taxa zu diesem Zeitpunkt etwa gleichauf (Abbildung 25).



Abbildung 25: Maximal erreichte qL-Werte während einer fünfminütigen Induktionskurve aus einem dunkeladaptierten Zustand zu einer konstanten PAR von 357  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> im Verlauf eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Messungen erfolgten nach drei und sechs Wochen sowie nach neun Monaten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 6).

Der NPQ liegt nach drei Wochen bei *D. cespitosa* in Kollmar höher als bei den drei anderen Varianten (Abbildung 26). Nach sechs Wochen sinken die Werte beider Taxa in Kollmar ab und liegen nun gleichauf. Die Werte im Krempermoor hingegen steigen, besonders stark bei *D. wibeliana*. Nach neun Monaten steigen die Werte bei beiden Taxa in Kollmar und bei *D. cespitosa* im Krempermoor stark an. Nur der NPQ-Wert der *D. wibeliana*-Pflanzen im Krempermoor verändert sich nicht und liegt zu diesem Zeitpunkt deutlich unter dem der *D. cespitosa*-Pflanzen im Krempermoor. Die stark gestiegenen NPQ-Werte nach neun Monaten zeigen sich insbesondere beim maximal erreichten NPQ (NPQ<sub>max</sub>). Die Werte am Ende der Kurve (NPQ<sub>end</sub>) steigen im Vergleich zu sechs Wochen weniger stark an (Abbildung 26).



Abbildung 26: Maximale (NPQ max) und am Ende erreichte (NPQ end) NPQ-Werte während einer fünfminütigen Induktionskurve aus einem dunkeladaptierten Zustand zu einer konstanten PAR von 357  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> im Verlauf eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Messungen erfolgten nach drei und sechs Wochen sowie nach neun Monaten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 6).

#### 3.2.5. Untersuchung der Blattmorphologie nach reziproker Verpflanzung

Bei der SLA zeigt sich schon nach drei Wochen bei den periodisch überfluteten *D. cespitosa*-Pflanzen in Kollmar eine starke Erhöhung der auf das Trockengewicht bezogenen Blattfläche. Der Wert liegt mit 38,4 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> zweimal höher als bei den nicht überfluteten *D. cespitosa*-Pflanzen (19,3 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup>) und *D. wibeliana*, sowohl in Kollmar (17,6 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup>) als auch im Krempermoor mit 19,0 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> (Abbildung 27). Es wurde außerdem eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Taxon und Standort gefunden (Scheirer-Ray-Hare Test; n = 4; p = 0,0186). Nach sechs Wochen sinkt der Wert bei *D. cespitosa* in Kollmar zwar auf 31,1 m<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup>, liegt aber immer noch deutlich höher als *D. cespitosa* im Krempermoor und *D. wibeliana* an beiden Standorten. Der Effekt des Taxons ist zu diesem Zeitpunkt signifikant (Scheirer-Ray-Hare Test; n = 4; p = 0,0022). Auch nach neun Monaten bleibt dieses Muster erhalten, auch wenn es keinen signifikanten Taxon-Effekt mehr gibt (Scheirer-Ray-Hare Test; n = 4; p = 0,2548).



Abbildung 27: Spezifische Blattfläche bezogen auf das Trockengewicht im Verlauf eines neunmonatigen Verpflanzungsexperiments im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Messungen erfolgten nach drei und sechs Wochen sowie nach neun Monaten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).

Bei der Gasfilmdicke zeigt sich kein klarer Trend. Interessant ist jedoch, dass das Muster bei *D. wibeliana* an beiden Standorten gleich ist, jedoch mit höheren Werten im Krempermoor an allen drei Zeitpunkten (Abbildung 28). Bei *D. cespitosa* hingegen verläuft die Entwicklung der Gasfilmdicke an beiden Standorten genau gegensätzlich: nach drei Wochen ist die Gasfilmdicke in Kollmar höher als im Krempermoor und sinkt nach sechs Wochen in Kollmar stark ab, während sie im Krempermoor stark ansteigt. Nach neun Monaten steigt sie in Kollmar deutlich an, während der Wert im Krempermoor stark sinkt. Die Ergebnisse einer zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen zeigen außerdem eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren "Taxon", "Standort" und "Zeit" (n = 4; F = 6,66; p = 0,0035).



Abbildung 28: Gasfilmdicke auf der Blattoberfläche im Verlauf eines neunmonatigen Verpflanzungsexperiments im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Messungen erfolgten nach drei und sechs Wochen sowie nach neun Monaten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).

Die Blattporosität steigt bei periodisch überfluteten *D. cespitosa*-Pflanzen in Kollmar im Verlauf des Experiments kontinuierlich von 15,4 % nach drei Wochen auf 18,5 % nach neun Monaten an (Abbildung 29). Die *D. wibeliana*-Pflanzen in Kollmar hingegen zeigen nach drei Wochen mit 23,5 % den höchsten Wert, der nach sechs Wochen auf 16,3 % absinkt und nach neun Monaten wieder ansteigt auf 22,4 %. Das gleiche Muster zeigen im Krempermoor beide Taxa: zunächst ein Absinken der Blattporosität nach sechs Wochen und ein starker Anstieg nach neun Monaten. Besonders stark sinkt der Wert nach sechs Wochen bei *D. wibeliana* im Krempermoor (8,5 %). Nach neun Monaten liegt nur die Blattporosität der *D. cespitosa*-Pflanzen in Kollmar niedriger als die der anderen drei Gruppen (Abbildung 29). Die Ergebnisse einer zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen zeigen signifikante Effekte für alle Interaktionen erster Ordnung: "Taxon\*Standort" (n = 4; F = 10,9; p = 0,0022), "Taxon\*Zeit" (n = 4; F = 5,68; p = 0,0072) und "Standort\*Zeit" (n = 4; F = 3,98; p = 0,027).



Abbildung 29: Blattporosität (Anteil gasgefüllter Räume) im Verlauf eines neunmonatigen Verpflanzungsexperiments im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Messungen erfolgten nach drei und sechs Wochen sowie nach neun Monaten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).

Die Ergebnisse der Blatthydrophobizität, gemessen anhand des Kontaktwinkels eines  $5 \text{ mm}^3$  Wassertropfens auf der Oberfläche, sind beispielhaft in Abbildung 30 dargestellt. Die Blatthydrophobizität liegt auf der adaxialen Blattseite generell hoch mit Kontaktwinkeln  $> 120 \circ$ . Nur nach sechs Wochen fallen die Werte in Kollmar bei *D. cespitosa* auf 70,3  $\circ$  und bei *D. wibeliana* auf 110,8  $\circ$  ab (Abbildung 31). Nach neun Monaten liegen aber auch dort die Werte mit 123,9  $\circ$  bei *D. cespitosa* und 129,8  $\circ$  bei *D. wibeliana* wieder deutlich höher. Auf der abaxialen Blattseite ist die Hydrophobizität bei beiden Taxa an beiden Standorten mit Kontaktwinkeln  $< 90 \circ$  deutlich geringer. Auch hier zeigt sich nach sechs Wochen ein deutliches Absinken des Werts bei periodisch überfluteten Pflanzen in Kollmar, allerdings nur bei *D. cespitosa* (Abbildung 32).



Abbildung 30: Beispiel für die Messung der Blatthydrophobizität anhand des Kontaktwinkels eines 5 mm<sup>3</sup> Wassertropfens auf der Blattoberfläche. A: hohe Blatthydrophobizität auf der adaxialen Blattseite eines *D. cespitosa* Blattes. B: geringe Blatthydrophobizität auf der abaxialen Blattseite eines *D. cespitosa* Blattes. Für eine genaue Erläuterung der Kontaktwinkelmessung siehe Abschnitt 2.3.5.4. im Kapitel Material und Methoden.



Abbildung 31: Hydrophobizität der adaxialen Blattseite, gemessen anhand des Kontaktwinkels eines  $5 \text{ mm}^3$  Wassertropfens, im Verlauf eines neunmonatigen Verpflanzungsexperiments im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Messungen erfolgten nach drei und sechs Wochen sowie nach neun Monaten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).



Abbildung 32: Hydrophobizität der abaxialen Blattseite, gemessen anhand des Kontaktwinkels eines  $5 \text{ mm}^3$  Wassertropfens, im Verlauf eines neunmonatigen Verpflanzungsexperiments im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Messungen erfolgten nach drei und sechs Wochen sowie nach neun Monaten. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).



**Abbildung 33: Blattquerschnitte sechs Wochen nach reziproker Verpflanzung im Freiland.** Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit Toluidinblau. Maßstabsbalken entsprechen 200 µm.



Abbildung 34: Blattquerschnitte neun Monate nach reziproker Verpflanzung im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit Toluidinblau. Maßstabsbalken entsprechen 200 µm.

Die Blattquerschnitte beider Taxa sind beispielhaft in den Abbildung 33 und 34 dargestellt. Die daraus bestimmte mittlere Blattdicke liegt nach sechs Wochen an beiden Standorten bei *D. cespitosa* niedriger als bei *D. wibeliana* (Abbildung 35). Außerdem sind die Blätter bei beiden Taxa in Kollmar dünner als im Krempermoor. Bei *D. wibeliana* ist der Unterschied zwischen den Standorten nur sehr gering, während es bei *D. cespitosa* einen deutlichen Standortunterschied gibt. Nach neun Monaten gibt es nur noch geringe Unterschiede zwischen den Taxa. Die Blätter sind aber tendenziell immer noch bei *D. wibeliana* dicker. Nach neun Monaten bestehen hingegen keine Unterschiede zwischen den Standorten bestehen hingegen keine Unterschiede zwischen den unterschiede zwischen den Standorten bestehen hingegen keine Unterschiede zwischen den Standorten mehr. Im Vergleich zum ersten Messzeitpunkt nach sechs Wochen sind die untersuchten Blätter nach neun Monaten bei *D. wibeliana* dünner und bei *D. cespitosa* gleich

dick (Krempermoor) oder dicker (Kollmar) (Abbildung 35). Dies wird durch die ANOVA-Ergebnisse unterstützt, die eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren "Taxon" und "Zeit" zeigen (n = 3; F = 6,58; p = 0,021).



Abbildung 35: Blattdicke nach sechs Wochen und neun Monaten im Verlauf eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Werte wurden lichtmikroskopisch anhand von Blattquerschnitten bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 3).

Bei der Blattbreite zeigt sich ein sehr ähnliches Muster wie bereits bei der Blattdicke beschrieben (s.o.). Nach sechs Wochen gibt es deutliche Unterschiede zwischen den Taxa mit breiteren Blättern bei *D. wibeliana* (Abbildung 36). Unterschiede zwischen den Standorten gibt es bei der Blattbreite nur bei *D. cespitosa* und auch dort nur schwach ausgeprägt. Nach neun Monaten sind die Blätter beider Taxa an beiden Standorten etwa gleich breit. Die ANOVA-Ergebnisse zeigen auch bei der Blattbreite eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren "Taxon" und "Zeit" (n = 3; F = 6,74; p = 0,020).



Abbildung 36: Blattbreite nach sechs Wochen und neun Monaten im Verlauf eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Werte wurden lichtmikroskopisch anhand von Blattquerschnitten bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 3).

Nach sechs Wochen unterscheidet sich die Anzahl adaxialer Epidermiszellen sowohl zwischen den Taxa als auch zwischen den Standorten stark (Abbildung 37). *D. wibeliana* weist an beiden Standorten deutlich mehr adaxiale Epidermiszellen auf als *D. cespitosa* und bei beiden Taxa liegen die Werte im Krempermoor deutlich höher als in Kollmar. Nach neun Monaten lassen sich jedoch keine großen Unterschiede zwischen den Taxa oder Standorten mehr feststellen. Die Ergebnisse einer zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen zeigen eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren "Taxon" und "Zeit" (n = 3; F = 7,17; p = 0,016).



Abbildung 37: Anzahl adaxialer Epidermiszellen im Querschnitt nach sechs Wochen und neun Monaten im Verlauf eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Werte wurden lichtmikroskopisch anhand von Blattquerschnitten bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 3).

Das Verhältnis der Blattoberfläche zum –volumen liegt nach sechs Wochen an beiden Standorten bei *D. cespitosa* höher als bei *D. wibeliana* (Abbildung 38). Zwischen den Standorten gibt es hingegen nur bei *D. cespitosa* geringfügige Unterschiede mit tendenziell höheren Werten bei den periodisch überfluteten Pflanzen in Kollmar. Nach neun Monaten gibt es durch einen Anstieg der Werte bei *D. wibeliana* und ein Absinken bei *D. cespitosa* kaum noch Unterschiede zwischen beiden Taxa. Die Ergebnisse einer zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholungen zeigen auch hier eine signifikante Interaktion zwischen "Taxon" und "Zeit" (n = 3; F = 5,93; p = 0,027).



Abbildung 38: Verhältnis der Blattoberfläche zum Blattvolumen nach sechs Wochen und neun Monaten im Verlauf eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland. Pflanzen am natürlichen *D. wibeliana*-Standort Kollmar waren tidebedingter periodischer Überflutung ausgesetzt, am natürlichen *D. cespitosa*-Standort Krempermoor wurden die Pflanzen nicht überflutet. Werte wurden lichtmikroskopisch anhand von Blattquerschnitten bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 3).

#### 3.2.6. Pilzbefall beider Taxa im Krempermoor

Der Pilzbefall nach sechs Wochen im Krempermoor zeigt deutliche taxonspezifische Unterschiede mit einem Median von 4 (76-100 %) bei *D. wibeliana* und 3 (51-75 %) bei *D. cespitosa* (Abbildung 39). Außerdem gibt es bei *D. wibeliana* keine Variabilität innerhalb der Daten, da alle Pflanzen in die höchste Kategorie 4 fallen. Bei *D. cespitosa* hingegen sind Pflanzen in allen vier Kategorien vertreten. Der Unterschied zwischen den Taxa ist statistisch signifikant (Mann-Whitney U-Test: n = 15; Z = -2,47; p = 0,014).



Abbildung 39: Pilzbefall an Blättern im Krempermoor sechs Wochen nach Beginn eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland. Der Pilzbefall wurde nach prozentualem Anteil befallener Blätter in vier Kategorien eingeteilt: 1 = 0.25 %, 2 = 26-50 %, 3 = 51-75 %, 4 = 76-100 %. Der Stichprobenumfang beträgt n = 15.

#### 3.2.7. Deckung beider Taxa in Kollmar

Bei der Deckung in Kollmar nach neun Monaten zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Taxa mit einer mittleren Deckung von 8,18 cm<sup>2</sup> bei *D. cespitosa* und 61,82 cm<sup>2</sup> bei *D. wibeliana* (Abbildung 40). Das Ergebnis eines t-Tests zeigt jedoch nur einen nahezu signifikanten Unterschied (n = 9; t-Wert = -1,89; p = 0,0767).



Abbildung 40: Deckung der Blätter am Standort Kollmar neun Monate nach Beginn eines reziproken Verpflanzungsexperiments im Freiland. Die Bestimmung der Deckung erfolgte mit Hilfe von Fotografien aus der Aufsicht aus 1 m Höhe und anschließender Bestimmung der Flächen, die von grünen Blattteilen bedeckt waren. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 9).

# 3.3. Unterwasser-Photosynthese und Unterwasser-Gasaustausch

# 3.3.1. Klimakammerexperiment zur Untersuchung der Unterwasser-Photosynthese und der morphologischen Akklimatisierung

#### 3.3.1.1. Photosynthese-Effektivität in Reaktion auf periodische Überflutung

Der  $F_v/F_m$  liegt bei beiden Taxa in den periodisch überfluteten Pflanzen höher. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (Faktor "Behandlung"; ANOVA; n = 4; F = 15,7; p = 0,0019) und insbesondere bei *D. cespitosa* stark ausgeprägt aufgrund des niedrigen  $F_v/F_m$ der Kontrollpflanzen. Die nicht überfluteten Kontrollpflanzen von *D. cespitosa* unterscheiden sich außerdem signifikant von den drei anderen Varianten (ANOVA; Tukey-HSD *post hoc* Test; n = 4; siehe Abbildung 41). Auch die Unterschiede zwischen den Taxa sind signifikant (Faktor "Taxon"; ANOVA; n = 4; F = 8,14; p = 0,015). Sowohl die periodisch überfluteten Pflanzen als auch die Kontrollpflanzen von *D. wibeliana* weisen höhere  $F_v/F_m$ -Werte auf als die *D. cespitosa*-Pflanzen (Abbildung 41).



Abbildung 41: Maximale Quantenausbeute des PS II ( $F_v/F_m$ ) nach drei Wochen periodisch wiederkehrender Überflutung in einer Klimakammer. Messungen erfolgten nach drei Wochen an zwei Zeitpunkten: morgens, vor Beginn der Überflutungsphase und abends, direkt nach der Überflutungsphase. Pro Pflanze wurden drei Blätter untersucht und der Mittelwert als Einzelwert weiterverwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).

Bei den höchsten erreichten  $\Phi_{PSII}$ -Werten am Ende der Induktionskurve zeigt sich ein vergleichbares Muster (Abbildung 42). In beiden Behandlungen weist *D. wibeliana* höhere  $\Phi_{PSII}$ -Werte auf als *D. cespitosa* (Faktor "Taxon"; Scheirer-Ray-Hare Test; n = 4; p = 0,021) und beide Taxa haben eine höhere  $\Phi_{PSII}$  bei den periodisch überfluteten Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle (Faktor "Behandlung"; Scheirer-Ray-Hare Test; n = 4; p = 0,021).



Abbildung 42: Höchste erreichte  $\Phi_{PSII}$ -Werte im Verlauf einer fünfminütigen Induktionskurve bei einer PAR von 110 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> nach drei Wochen periodisch wiederkehrender Überflutung in einer Klimakammer. Messungen erfolgten nach drei Wochen an zwei Zeitpunkten: morgens, vor Beginn der Überflutungsphase und abends, direkt nach der Überflutungsphase. Pro Pflanze wurden drei Blätter untersucht und der Mittelwert als Einzelwert weiterverwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).

Bei den gemessenen  $\Phi_{NPQ}$ -Werten sollen zwei Kardinalpunkte der Kurvenverläufe betrachtet werden: der Maximalwert  $\Phi_{NPQ max}$ , der kurz nach Einschalten des Licht erreicht wird, und der  $\Phi_{NPQ end}$ , der am Ende der Induktionskurve erreicht wird und niedriger ist als der  $\Phi_{NPQ max}$ . Für  $\Phi_{NPQ max}$  sind keine Unterschiede zwischen den Taxa festzustellen (Abbildung 43), die höheren Werte der periodisch überfluteten Pflanzen beider Taxa im Vergleich zur Kontrolle sorgen aber für einen signifikanten Effekt der Behandlung (ANOVA; n = 4; F = 6,20; p = 0,028). Im Verlauf der Induktionskurven sinkt der  $\Phi_{NPQ}$  ab und erreicht am Ende deutlich niedrigere Werte. Insbesondere die Werte der periodisch überfluteten Pflanzen sinken sehr stark und liegen am Ende deutlich niedriger als die der Kontrollpflanzen ( $\Phi_{NPQ end}$ in Abbildung 43). Außerdem sinken die Werte in beiden Behandlungen bei *D. wibeliana* stärker ab als bei *D cespitosa*, sodass sowohl der Faktor "Behandlung" (ANOVA; n = 4; F = 5,72; p = 0,034) als auch der Faktor "Taxon" signifikante Effekte aufweist (ANOVA; n = 4; F = 7,22; p = 0,020).



Abbildung 43: Maximale ( $\Phi_{NPQ}$  max) und am Ende erreichte ( $\Phi_{NPQ}$  end)  $\Phi_{NPQ}$ -Werte im Verlauf einer fünfminütigen Induktionskurve bei einer PAR von 110 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> nach drei Wochen periodisch wiederkehrender Überflutung in einer Klimakammer. Messungen erfolgten nach drei Wochen an zwei Zeitpunkten: morgens, vor Beginn der Überflutungsphase und abends, direkt nach der Überflutungsphase. Pro Pflanze wurden drei Blätter untersucht und der Mittelwert als Einzelwert weiterverwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).

Der  $\Phi_{NO}$ -Wert, der am Ende der Induktionskurve erreicht wird ( $\Phi_{NO end}$ ), liegt morgens vor der Überflutungsphase bei beiden Taxa in den periodisch überfluteten Pflanzen niedriger als in den Kontrollpflanzen (Abbildung 44). Der Effekt der Behandlung ist statistisch signifikant (ANOVA; n = 4; F = 5,50; p = 0,037). Abends nach der Überflutungsphase liegen die Werte bei den periodisch überfluteten Pflanzen höher als morgens und etwa gleichauf mit den Kontrollpflanzen (Abbildung 44). Tendenziell weist *D. cespitosa* höhere Werte auf als *D. wibeliana*, es gibt jedoch keinen signifikanten Effekt für den Faktor "Taxon" (ANOVA; n = 4; F = 0,999; p = 0,34).



Abbildung 44: Nach drei Wochen periodisch wiederkehrender Überflutung in einer Klimakammer gemessene  $\Phi_{NO}$ -Werte, am Ende einer fünfminütigen Induktionskurve bei einer PAR von 110 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Messungen erfolgten nach drei Wochen an zwei Zeitpunkten: morgens, vor Beginn der Überflutungsphase und abends, direkt nach der Überflutungsphase. Pro Pflanze wurden drei Blätter untersucht und der Mittelwert als Einzelwert weiterverwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).

Der maximal erreichte qL-Wert qL<sub>max</sub> liegt bei den periodisch überfluteten *D. wibeliana*-Pflanzen am höchsten (Abbildung 45). Generell liegen die Werte bei *D. wibeliana* höher als bei *D. cespitosa* und bei den periodisch überfluteten Pflanzen höher als bei den Kontrollpflanzen. Für beide Faktoren sind die Effekte jedoch nur nahezu signifikant (ANOVA; n = 4; Faktor "Taxon": F = 3,85; p = 0,073; Faktor "Behandlung": F = 4,21; p = 0,063).



Abbildung 45: Maximal erreichte qL-Werte im Verlauf einer fünfminütigen Induktionskurve bei einer PAR von 110  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> nach drei Wochen periodisch wiederkehrender Überflutung in einer Klimakammer. Messungen erfolgten nach drei Wochen an zwei Zeitpunkten: morgens, vor Beginn der Überflutungsphase und abends, direkt nach der Überflutungsphase. Pro Pflanze wurden drei Blätter untersucht und der Mittelwert als Einzelwert weiterverwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).

Für den NPQ-Wert werden der Maximalwert NPQ<sub>max</sub> und der Wert am Ende der Induktionskurve NPQ<sub>end</sub> betrachtet. Morgens liegt der NPQ<sub>max</sub> bei beiden Taxa in den periodisch überfluteten Pflanzen höher als in den Kontrollpflanzen (Abbildung 46). Der Effekt der Behandlung ist für NPQ<sub>max</sub> signifikant (ANOVA; n = 4; F = 10,68; p = 0,0067). Im Verlauf der Induktionskurve sinken die Werte insbesondere bei den periodisch überfluteten Pflanzen stark ab, sodass diese am Ende niedrigere Werte aufweisen als die Kontrollpflanzen (NPQ<sub>end</sub> in Abbildung 46). Der Effekt der Behandlung ist jedoch für NPQ<sub>end</sub> nicht signifikant (ANOVA; n = 4; F = 2,03; p = 0,18). Der NPQ sinkt außerdem bei *D. wibeliana* im Verlauf der Kurve stärker als bei *D. cespitosa* und der Effekt des Taxons ist für NPQ<sub>end</sub> nicht signifikant (ANOVA; n = 4; F = 3,56; p = 0,084).



Abbildung 46: Maximale (NPQ max) und am Ende erreichte (NPQ end) NPQ-Werte im Verlauf einer fünfminütigen Induktionskurve bei einer PAR von 110  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> nach drei Wochen periodisch wiederkehrender Überflutung in einer Klimakammer. Messungen erfolgten nach drei Wochen an zwei Zeitpunkten: morgens, vor Beginn der Überflutungsphase und abends, direkt nach der Überflutungsphase. Pro Pflanze wurden drei Blätter untersucht und der Mittelwert als Einzelwert weiterverwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).

#### 3.3.1.2. Unterwasser-Photosynthese und -Dunkelatmung

Bei den Kontrollpflanzen weist *D. wibeliana* eine höhere Unterwasser-Nettophotosynthese auf als *D. cespitosa* (Abbildung 47 A). Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (ANOVA; Tukey-HSD *post hoc* Test; n = 4; p = 0,42). Beide Taxa haben in der periodisch überfluteten Variante höhere Nettophotosyntheseraten. Den höchsten Wert erreichen die periodisch überfluteten Pflanzen von *D. cespitosa*, die sich signifikant von allen drei anderen Versuchsgruppen unterscheiden (ANOVA; Tukey-HSD *post hoc* Test; n = 4). Außerdem zeigen die Ergebnisse der ANOVA, dass es eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren "Behandlung" und "Taxon" gibt (n = 4; F = 8,67; p = 0,012). Das kommt dadurch zustande, dass bei den Kontrollpflanzen *D. wibeliana* eine höhere Nettophotosynthese aufweist und bei den periodisch überfluteten Pflanzen *D. cespitosa* (Abbildung 47 A). Während die Unterschiede zwischen den Behandlungen bei *D. wibeliana* nur sehr gering sind, ist die Nettophotosynthese bei *D. cespitosa* in den periodisch überfluteten Pflanzen um das zweifache erhöht.

Bezüglich der Unterwasser-Dunkelatmung gibt es bei *D. cespitosa* kaum Unterschiede zwischen den periodisch überfluteten Pflanzen und den Kontrollpflanzen. *D. wibeliana* weist hingegen eine höhere Dunkelatmung in den Kontrollpflanzen auf (Abbildung 47 B). Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Die Ergebnisse der ANOVA zeigen keine signifikanten Effekte, weder für den Faktor "Behandlung" (n = 4; F = 0,42; p = 0,53) noch für den Faktor "Taxon" (n = 4; F = 0,003; p = 0,95).



Abbildung 47: Unterwasser-Nettophotosynthese (A) und –Dunkelatmung (B) bezogen auf die Trockenmasse nach dreiwöchiger periodisch wiederkehrender Überflutung in einer Klimakammer. Überflutete Pflanzen wurden zweimal täglich fünfstündig überflutet, Kontrollpflanzen waren keiner Überflutung ausgesetzt. Die Nettophotosynthese wurde unter Wasser bei 140  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> und 200  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> freiem CO<sub>2</sub> bestimmt. Nettophotosynthese und Dunkelatmung wurden an denselben Blattproben gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4). Unterschiedliche Großbuchstaben weisen auf signifikante Unterschiede hin (ANOVA; Tukey HSD *post hoc* Test;  $\alpha = 0,05$ ).

#### 3.3.1.3. Untersuchung der Blattmorphologie

Die SLA bei *D. wibeliana* liegt bei periodisch überfluteten Pflanzen und Kontrollpflanzen auf gleicher Höhe. Bei *D. cespitosa* gibt es eine deutliche Erhöhung der SLA in den periodisch überfluteten Pflanzen (Abbildung 48). Im Vergleich zu *D. wibeliana* weisen die Kontrollpflanzen von *D. cespitosa* nur leicht höhere Werte auf, die periodisch überfluteten Pflanzen jedoch deutlich höhere Werte. Die Ergebnisse der ANOVA zeigen einen signifikanten Effekt für den Faktor "Taxon" (n = 4; F = 6,59; p = 0,025). Außerdem zeigt ein anschließender Tukey HSD *post hoc* Test nahezu signifikante Unterschiede zwischen den periodisch überfluteten Pflanzen von *D. cespitosa* und sowohl den überfluteten Pflanzen von *D. wibeliana* (n = 4; p = 0,067) als auch den Kontrollpflanzen (n = 4; p = 0,078).



Abbildung 48: Spezifische Blattfläche (SLA) bezogen auf die Trockenmasse nach drei Wochen periodisch wiederkehrender Überflutung in einer Klimakammer. Überflutete Pflanzen wurden zweimal täglich fünfstündig überflutet, Kontrollpflanzen waren keiner Überflutung ausgesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).

Die Gasfilmdicke liegt bei periodisch überfluteten Pflanzen und Kontrollpflanzen bei *D. wibeliana* signifikant höher als bei *D. cespitosa* (Abbildung 49 A; ANOVA; Tukey-HSD *post hoc* Test; n = 4). Der Effekt für den Faktor "Taxon" ist außerdem signifikant (ANOVA; n = 4; F = 71,5; p < 0,001). Innerhalb der Taxa gibt es keine deutlichen Unterschiede zwischen periodisch überfluteten Pflanzen und Kontrollpflanzen.

Bei der Blattporosität gibt es ebenfalls einen signifikanten Effekt des Taxons (ANOVA; n = 4; F = 7,07; p < 0,021). In beiden Behandlungen weist *D. cespitosa* eine höhere Blattporosität auf als *D. wibeliana* (Abbildung 49 B). Die periodische Überflutung hat keinen signifikanten Effekt auf die Blattporosität (ANOVA; n = 4; F = 0,607; p = 0,45).



Abbildung 49: Gasfilmdicke (A) und Blattporosität (B) nach drei Wochen periodisch wiederkehrender Überflutung in einer Klimakammer. Überflutete Pflanzen wurden zweimal täglich fünfstündig überflutet, die Kontrollpflanzen waren keiner Überflutung ausgesetzt. Beide Parameter wurden mit einer Auftriebswaage unter Anwendung des archimedischen Prinzips bestimmt. Die Gasfilmdicke beschreibt die Höhe des Gasfilms, der sich beim Untertauchen der Blätter beider Taxa unter Wasser auf der adaxialen Blattseite bildet. Die Blattporosität beschreibt den prozentualen Anteil der Gasräume im Blattgewebe. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4). Unterschiedliche Großbuchstaben weisen auf signifikante Unterschiede hin (ANOVA; Tukey HSD *post hoc* Test;  $\alpha = 0,01$ ).

# 3.3.2. Gewächshausexperiment zum Unterwasser-Gasaustausch

#### 3.3.2.1. Wurzelmorphologie periodisch überfluteter Pflanzen

Die Wurzelmorphologie wurde an Pflanzen, die zuvor drei Wochen periodisch überflutet worden waren, untersucht, um den radiären Wurzelaufbau besser einschätzen zu können und so die nötige Einstichtiefe zur Messung des  $pO_2$  im Wurzelaerenchym zu ermitteln. Die Querschnitte zeigen, dass bei beiden Taxa über die gesamte Länge Aerenchym über einen Radius von 100-200 µm ausgebildet ist, welches von einem etwa 100-150 µm dicken Rindenparenchym umgeben ist (Abbildung 50).



Abbildung 50: Wurzelquerschnitte nach drei Wochen periodischer Überflutung in einer Klimakammer. Die Querschnitte von jungen Adventivwurzeln wurden an vier Stellen angefertigt: direkt am Wurzel-Spross-Übergang (0 cm), 5 cm weiter, 10 cm weiter und 1 cm von der Wurzelspitze entfernt (-1 cm).

#### 3.3.2.2. Sauerstoffpartialdruck im Wurzelaerenchym

Nach Überflutung der Wurzeln mit deoxigeniertem Medium im Dunkeln mit dem Spross an der Luft sinkt der  $pO_2$  im Wurzelaerenchym ab und erreicht nach etwa 1-2 h einen Minimalwert (Abbildung 51). Eine anschließende vollständige Überflutung des Sprosses mit luftgesättigtem Medium führt zu einem weiteren deutlichen Absinken des  $pO_2$  auf ein niedrigeres Level innerhalb von 2-3 h. Das Bestrahlen des überfluteten Sprosses mit einer PAR von ca. 120 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> führt zu einem schnellen Anstieg des  $pO_2$  im Wurzelaerenchym, bis nach etwa 30-60 min ein Maximalwert erreicht wird (Abbildung 51).



Abbildung 51: Beispielhafter Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks im Wurzelaerenchym im Verlauf einer Überflutungsphase im Dunkeln und im Licht. Zunächst erfolgten die Messungen im Dunkeln. Nach Platzierung der O<sub>2</sub>-Mikroelektrode im Wurzelaerenchym wurden die Wurzeln mit deoxigeniertem Medium überflutet und es wurde gewartet bis der Minimalwert erreicht wurde. Anschließend wurde der Spross vollständig mit luftgesättigtem Medium überflutet und erneut der Minimalwert abgewartet. Zum Schluss wurde der überflutete Spross mit einer PAR von ca. 120 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> bestrahlt und der Maximalwert nach Anstieg des pO<sub>2</sub> abgewartet (siehe auch Abschnitt 2.3.4.2.).

Nach sechs Wochen erreichen periodisch überflutete Pflanzen und Kontrollpflanzen beider Taxa im Dunkeln, mit dem Spross an der Luft O<sub>2</sub>-Werte zwischen 33,2 und 60,4 % air sat. Nur die periodisch überfluteten *D. wibeliana*-Pflanzen weisen mit 33,2 % air sat. einen deutlich niedrigeren Wert auf als die übrigen drei Varianten mit 53,7-60,4 % air sat. (Abbildung 52). Bei anschließender Überflutung des Sprosses im Dunkeln sinken die Werte bei Kontroll- und periodisch überfluteten Pflanzen auf Werte zwischen 3,6 und 6,4 % air sat. ab. Das Einschalten einer Lichtquelle mit einer PAR von 120 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> führt bei beiden Taxa zu einer deutlichen Erhöhung des pO<sub>2</sub> auf 32,2-39,8 % air sat. sowohl in periodisch überfluteten Pflanzen als auch in den Kontrollpflanzen (Abbildung 52).



Abbildung 52: Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) im Wurzelaerenchym nach sechs Wochen periodischer Überflutung im Gewächshaus. Kontrollpflanzen waren in diesem Zeitraum keiner Überflutung ausgesetzt. Gemessen wurde in jungen Adventivwurzeln, in 5 cm Entfernung zum Wurzel-Spross-Übergang. Es wurden drei Zustände untersucht, bei denen alle Pflanzen (Überflutung und Kontrolle) den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren: mit dem Spross an der Luft im Dunkeln; mit dem Spross vollständig überflutet im Dunkeln und mit dem Spross vollständig überflutet bei einer PAR von 120 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).
Nach acht Wochen periodischer Überflutung im Gewächshaus liegen die  $pO_2$ -Werte im Dunkeln mit dem Spross an der Luft zwischen 46,2 und 61,8 % air sat. (Abbildung 53 A). Bei Überflutung des Sprosses sinken die Werte in allen Varianten stark ab. In den periodisch überfluteten Pflanzen auf 4,3 % air sat. bei *D. cespitosa* und 3,4 % air sat. bei *D. wibeliana* und in den Kontrollpflanzen auf 0,5 % air sat. bei *D. cespitosa* und 1,1 % air sat. bei *D. wibeliana* (Abbildung 53 B). Die Unterschiede zwischen Kontrollpflanzen und periodisch überfluteten Pflanzen sind statistisch signifikant (Faktor "Behandlung"; Scheirer-Ray-Hare Test; n = 4; p = 0,0045). Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Taxa gefunden (Faktor "Taxon"; Scheirer-Ray-Hare Test; n = 4; p = 0,9581). Interessant ist außerdem, dass bei überflutetem Spross in der Dunkelheit in drei der vier untersuchten Kontrollpflanzen von *D. cespitosa* anoxische Verhältnisse erreicht werden, während dies bei *D. wibeliana* nur bei einer der Kontrollpflanzen der Fall ist. In den zuvor periodisch überfluteten Pflanzen werden in keinem der Replikate anoxische Verhältnisse erreicht.



Abbildung 53: Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) im Wurzelaerenchym nach acht Wochen periodischer Überflutung im Gewächshaus. Kontrollpflanzen waren in diesem Zeitraum keiner Überflutung ausgesetzt. Gemessen wurde in jungen Adventivwurzeln, in 5 cm Entfernung zum Wurzel-Spross-Übergang. Es wurden zwei Zustände untersucht, bei denen alle Pflanzen (Überflutung und Kontrolle) den gleichen Bedingungen ausgesetzt waren: mit dem Spross an der Luft im Dunkeln (A) und mit dem Spross vollständig überflutet im Dunkeln (B). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).

## 3.3.2.3. Biomasse-Allokation in Reaktion auf periodische Überflutung

Das Verhältnis von oberirdischer zu unterirdischer Trockenmasse liegt nach acht Wochen mit 3,72 für *D. cespitosa* und 3,96 für *D. wibeliana* bei den periodisch überfluteten Pflanzen tendenziell höher als bei den Kontrollpflanzen mit 2,70 und 3,29 (Abbildung 54). Diese Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant (Faktor "Behandlung"; ANOVA; n = 4; F = 2,77; p = 0,122).



Abbildung 54: Verhältnis von oberirdischer zu unterirdischer Trockenbiomasse nach acht Wochen periodischer Überflutung im Gewächshaus. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwerts (n = 4).

## 3.4. Übersicht der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind zusammenfassend in Tabelle 3 dargestellt:

**Tabelle 3: Übersicht der Ergebnisse aus Laborexperimenten und reziprokem Verpflanzungsexperiment im Freiland.** Die untersuchten Parameter sind im Vergleich zwischen den Taxa (*D. cespitosa* und *D. wibeliana*) und zwischen periodisch überfluteten Pflanzen und nicht überfluteten Pflanzen dargestellt. In der ersten Spalte werden die periodisch überfluteten Pflanzen zwischen beiden Taxa verglichen und in der zweiten Spalte die nicht überfluteten Pflanzen zwischen beiden Taxa (rote Pfeile stehen für signifikant höhere Werte bei *D. cespitosa*, grüne Pfeile für signifikant höhere Werte bei *D. cespitosa*, grüne Pfeile für signifikant höhere Werte bei *D. cespitosa*, grüne Pfeile für signifikant höhere Werte bei *D. cespitosa* die periodisch überfluteten mit den nicht überfluteten Pflanzen verglichen und in der vierten Spalte die periodisch überfluteten mit den nicht überfluteten Pflanzen verglichen und in der vierten Spalte die periodisch überfluteten mit den nicht überfluteten Pflanzen bei *D. wibeliana* (blaue Pfeile stehen für signifikant höhere Werte bei periodisch überfluteten Pflanzen, gelbe Pfeile für signifikant höhere Werte bei nicht überfluteten Pflanzen und graue Pfeile weisen auf keine Unterschiede hin). Bei Unterschieden zwischen Labor- und Freilandexperimenten wurden beide Ergebnisse aufgeführt: **1**) Labor; **2**) Freiland. Abkürzungen: SLA: Spezifische Blattfläche, ADH: Alkoholdehydrogenase, UW-P<sub>N</sub>: Unterwasser-Nettophotosynthese, UW-DR: Unterwasser-Dunkelatmung, n. g.: nicht gemessen.

	überflutet	nicht überflutet	D. cespitosa	D. wibeliana
Parameter	D. ces. / D. wib.	D. ces. / D. wib.	überfl./nicht überfl.	überfl./nicht überfl.
SLA		$\Rightarrow$	ſ	$\Rightarrow$
Gasfilmdicke	$\mathbf{\hat{f}}$	$\uparrow$	$\Rightarrow$	
Blattporosität			$\Rightarrow$	$\Rightarrow$
ADH-Aktivität	$\mathbf{\uparrow}$	⇒	$\mathbf{\uparrow}$	$\mathbf{\uparrow}$
UW-P <sub>N</sub>		$\Rightarrow$	$\mathbf{\uparrow}$	$\Rightarrow$
UW-DR	$\Rightarrow$	$\Rightarrow$	$\Rightarrow$	
Wurzel-pO <sub>2</sub>	$\Rightarrow$	$\Rightarrow$	<b>1</b>	$\mathbf{\uparrow}$
$F_v/F_m$	$\mathbf{\hat{t}}$			$\mathbf{\uparrow}$
$\Phi_{\text{psil}}$	$ \mathbf{h}^{1)} = \mathbf{h}^{2)} $			
$\Phi_{_{NPQmax}}$	$\Rightarrow$	$\Rightarrow$		
$\Phi_{\rm NOend}$	$\Rightarrow$	$\Rightarrow$		
qL	$\Rightarrow$	$\Rightarrow$		
Pilzbefall	n. g.	<b>1</b>	n. g.	n. g.
Deckung	$\mathbf{\uparrow}$	n.g.	n.g.	n. g.

# 4. Diskussion

# 4.1. Erste Experimente zur physiologischen Reaktion auf Überflutung unter kontrollierten Bedingungen

Da keine physiologischen Reaktionen auf vollständige Überflutung der untersuchten Taxa *Deschampsia cespitosa* und *D. wibeliana* bekannt waren, wurde zunächst auf mögliche Unterschiede in der physiologischen Reaktion unter kontrollierten Bedingungen in einer Klimakammer untersucht. Dabei wurde der Fokus auf periodische Überflutung mit täglich zwei vollständigen Überflutungsphasen gelegt, da dies der tidebedingten Überflutung im natürlichen Habitat von *D. wibeliana* entspricht.

#### 4.1.1. Regulation der Alkoholdehydrogenase in Blättern

Ein erstmaliges (initiales) fünfstündiges Überflutungsereignis hatte keinen Effekt auf die Enzymaktivität der ADH in Blättern von *D. cespitosa* und *D. wibeliana*. Bei beiden Taxa konnte innerhalb der Initialüberflutung keine Erhöhung der ADH-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 8). Lediglich zwei Stunden nach Beenden der Überflutung wurde ein Anstieg der ADH-Enzymaktivität in überfluteten *D. cespitosa*-Pflanzen gemessen (Abbildung 8). Dieser Anstieg ist jedoch nicht statistisch signifikant. Diese Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch den kurzen Zeitraum der Überflutung und die Versuchsbedingungen erklären.

Möglicherweise sinkt die Sauerstoffkonzentration im Blattgewebe innerhalb der initialen Überflutung nicht so stark, dass als Reaktion die ADH-Enzymaktivität erhöht wird. Es ist wahrscheinlich, dass innerhalb des kurzen Überflutungszeitraums von fünf Stunden keine anoxischen Verhältnisse in den Blättern überfluteter Pflanzen erreicht werden (Ricard et al., 1994). Eine schnelle Rückkehr zur Normoxie könnte somit die Ausbildung kritischer Sauerstoffkonzentrationen verhindert haben. Zu einer Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Gewebe kann auch Unterwasser-Photosynthese beitragen (Colmer et al., 2011), wenn Licht- und CO<sub>2</sub>-Angebot ausreichend sind (Winkel et al., 2013). Da das Experiment im Licht bei einer PAR von ca. 200  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> auf Höhe der Blätter durchgeführt wurde und die CO<sub>2</sub>-Konzentration im verwendeten Leitungswasser mit einem Mittelwert von 0,11 mmol L<sup>-1</sup> angegeben wird (siehe Anhang 1), sind die grundlegenden Voraussetzungen für eine Erhöhung der O<sub>2</sub>-Konzentration in den Blättern durch Unterwasser-Photosynthese gegeben. Es konnte nachgewiesen werden, dass die periodisch überfluteten Pflanzen beider Taxa auch bei geringeren Lichtintensitäten von 140  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> unter Wasser Nettophotosyntheseraten von 105  $\mu$ mol O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (*D. cespitosa*) und 75  $\mu$ mol O<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (*D. wibeliana*) aufweisen (Abbildung 47). Außerdem zeigen die Ergebnisse der Sauerstoffmessungen im Wurzelaerenchym, dass bei beiden Taxa eine deutliche Erhöhung des pO<sub>2</sub> in den Wurzeln erfolgt, sobald die vollständig überfluteten Blätter Licht ausgesetzt werden (Abbildung 52). Das ist ein deutlicher Hinweis auf eine Erhöhung der internen Sauerstoffkonzentration durch Unterwasser-Photosynthese bei beiden Taxa.

Die Anwesenheit von Licht bei Sauerstoffmangel führt zu einer geringeren Notwendigkeit der Energiegewinnung durch Fermentation in den oberirdischen Pflanzenteilen (Mustroph et al., 2006). Jedoch konnten Mustroph et al. (2006) auch zeigen, dass bei Weizen, der nicht überflutungstolerant ist, eine anaerobe Inkubation im Licht zu einer Erhöhung der fermentativen Kapazität in einer anschließenden Dunkelperiode führt. Einerseits könnte Licht für die Induktion von Genen, die fermentative Enzyme kodieren, notwendig sein (Mustroph et al., 2006), was bereits für den GapC4 Promotor in Mais nachgewiesen wurde (Hänsch et al., 2003). Andererseits könnte die durch die Photosynthese bereitgestellte Energie in Form von ATP vonnöten sein, um die Synthese essentieller Proteine zu gewährleisten (Mustroph et al., 2006). Für weitere Studien ist also auch die Untersuchung der ADH-Regulation in einer anschließenden Dunkelphase in überfluteten und nicht überfluteten Pflanzen interessant, da ein Anstieg der Enzymaktivität möglicherweise erst in dieser Phase erfolgt.

Trotz des nicht messbaren Anstiegs der ADH-Aktivität ist ein Absinken der O<sub>2</sub>-Konzentration auf hypoxische Level in den überfluteten Blättern sehr wahrscheinlich (eigene unveröffentlichte Daten). Ein Hinweis auf Hypoxie in den Blättern von *D. cespitosa* und *D. wibeliana* innerhalb einer initialen Überflutung ist der transiente Anstieg der *Adh1* Transkriptmenge (Abbildung 10; Ambroselli, 2013). Diese Reaktion ist charakteristisch für *Adh1* als Reaktion auf Hypoxie in verschiedenen pflanzlichen Geweben (Xie & Wu, 1989; Andrews et al., 1993; Benz et al., 2007). Es ist auch nicht ungewöhnlich, dass es innerhalb der fünfstündigen Überflutung keinen messbaren Anstieg der ADH-Aktivität trotz Induktion der Transkription gibt. Andrews et al. (1993) fanden in Maiskeimlingen ein Maximum der *Adh1* mRNA-Menge nach 6 h Hypoxie und das Maximum der ADH-Enzymaktivität erst nach 18 h Hypoxie.

Interessanterweise konnte aber gezeigt werden, dass periodische Überflutung mit zwei täglichen Überflutungsphasen von jeweils fünf Stunden bereits nach einer Woche eine

## Diskussion

deutlich erhöhte ADH-Aktivität in den Blättern beider Taxa induziert (Abbildung 9). Diese Erhöhung bleibt auch nach zwei und drei Wochen periodischer Überflutung erhalten, wobei zu diesen Zeitpunkten die Werte außerdem tendenziell bei den überfluteten Pflanzen von *D. wibeliana* höher liegen als bei *D. cespitosa*. Auch Andrews et al. (1994) wiesen in Maiskeimlingen nach, dass die Enzymaktivität der ADH eher langsam über einen längeren Zeitraum ansteigt, in diesem Fall im Verlauf von 48 h Hypoxie. Die vorliegenden Ergebnisse zur periodischen Überflutung weisen darauf hin, dass stetig wiederkehrende Stressreize, die alleine jeweils keine Veränderung der ADH-Aktivität induziert hätten, in der Summe letztendlich zu einer Erhöhung der ADH-Enzymaktivität führen. Dem Autor ist allerdings keine vergleichbare Studie zur ADH-Aktivität in Abhängigkeit von periodischer Überflutung bekannt, weshalb ein Vergleich mit anderen Arbeiten nicht möglich ist.

Möglicherweise führt eine Akkumulation der Transkripte zu einer langfristigen Erhöhung der Enzymaktivität. Bei einer initialen Überflutung wurde eine Induktion der *Adh1*-Transkription nachgewiesen (Ambroselli, 2013). Jedoch fand Ambroselli (2013) nach drei Wochen periodischer Überflutung keine Induktion der Transkription durch ein einzelnes Überflutungsereignis mehr (Abbildung 10). Im Gegensatz dazu ist die Proteinmenge der ADH nach drei Wochen im Vergleich zu nicht überfluten Kontrollpflanzen bei beiden Taxa deutlich erhöht (Abbildung 10). Das ist jedoch kein Widerspruch, da die ADH-Proteinsynthese nicht zwangsläufig mit einer erhöhten Transkription korreliert, sondern auch durch präferenzielle Translation und Verhinderung der mRNA-Sequestrierung reguliert werden kann (Fennoy et al., 1998; Branco-Price et al., 2008; Juntawong et al., 2013).

Diese Erhöhung der Aktivität und Proteinmenge ist konstitutiv, da es nach drei Wochen keine Unterschiede zwischen den zwei untersuchten Zeitpunkten (A: Pflanzen an der Luft; C: Pflanzen unter Wasser) gibt (Abbildung 10). Die ADH-Aktivität ist ein Maß für die Kapazität der ethanolischen Fermentation (Keeley, 1979; Mendelssohn et al., 1981; Burdick & Mendelssohn, 1990), die somit nach drei Wochen periodischer Überflutung in den Blättern konstitutiv erhöht ist. Dies ist ein Hinweis auf eine Überflutungstoleranz bei beiden untersuchten Taxa, da frühere Untersuchungen nachweisen konnten, dass tolerante Arten die ADH-Aktivität in Reaktion auf Überflutung in den oberirdischen Pflanzenteilen erhöhen, während intolerante Arten diese Erhöhung nicht zeigen (Xie & Wu, 1989; Kennedy et al., 1992; Kato-Noguchi, 1999). Für weitere Untersuchungen ist zusätzlich ein Vergleich der ADH-Aktivität in den Blättern mit der in den Wurzeln interessant, da nach Kennedy et al. (1992) überflutungstolerante Arten zwei Drittel ihrer ADH-Aktivität im Spross und ein Drittel

in den Wurzeln aufweisen und dieses Verhältnis bei nicht toleranten Arten umgekehrt ist (Cobb & Kennedy, 1987). Auch Mustroph et al. (2006) fanden deutlich höhere Spross/Wurzel Verhältnisse der ADH-Aktivität in überflutungstoleranten Pflanzen (Reis) verglichen mit nicht toleranten Pflanzen (Weizen).

Die in Abschnitt 1.7. gestellten Fragestellungen 1) "Regulieren beide Taxa in Reaktion auf periodische Überflutung die ADH in den Blättern herauf?" und 2) "Gibt es Unterschiede zwischen den Taxa bezüglich der ADH-Regulation in den Blättern?" können somit beantwortet werden: Beide Taxa regulieren die ADH in Reaktion auf periodische Überflutung herauf und es gibt tendenzielle Unterschiede zwischen den Taxa mit höheren ADH-Aktivitäten bei *D. wibeliana* (Abbildung 10).

# 4.1.2. Stresszustand der Pflanzen in Reaktion auf periodische Überflutung

Einen weiteren Hinweis auf den Grad der Überflutungstoleranz beider Taxa kann der  $F_v/F_m$ -Wert liefern, da er ein Maß für den Stress der Pflanzen darstellt (Baker, 2008). Die Mittelwerte beider Taxa liegen an den drei Messzeitpunkten (0, 2 und 4 Wochen) zwischen 0,72 und 0,77 (Abbildung 11), was auf leichte Photoinhibition hindeutet, da die optimalen  $F_v/F_m$ -Werte für ungestresste Höhere Pflanzen bei 0,83 liegen (Björkman & Demmig, 1987). Es sind aber keine Unterschiede zwischen periodisch überfluteten Pflanzen und Kontrollpflanzen festzustellen (kein signifikanter Effekt der Behandlung; Abbildung 11). Daher scheinen eher die allgemeinen Versuchsbedingungen, wie Temperatur, Licht, Luftfeuchtigkeit und Nährstoffverfügbarkeit, für die leicht niedrigeren Werte der maximalen Quantenausbeute des PS II verantwortlich zu sein, da diese sowohl auf die periodisch überfluteten als auch auf die Kontrollpflanzen einwirkten. Die Werte zwischen 0,72 und 0,77 deuten jedoch noch nicht auf Stress hin, da sie im Vergleich zum optimalen Wert von 0,83 nicht deutlich niedriger sind.

Interessanterweise gibt es aber einen signifikanten Taxon-Effekt, der durch niedrigere Werte bei *D. wibeliana* im Vergleich zu *D. cespitosa* zu Beginn des Experiments und nach zwei Wochen erklärt werden kann (Abbildung 11). *D. wibeliana* ist somit zunächst stärker gestresst, was sich im Verlauf des Experiments allerdings ändert (signifikanter Zeit-Effekt). Nach vier Wochen liegen überflutete Pflanzen und Kontrollpflanzen mit *D. cespitosa* gleichauf. Der anhand des  $F_v/F_m$  gemessene Stresszustand weist bei keinem der Taxa auf starken, durch periodische Überflutung verursachten Stress hin. Sarkar und Bhattacharjee (2011) konnten eine signifikante positive Korrelation des  $F_v/F_m$  mit der Überlebensrate verschiedener Reis-Kultivare nach Überflutung nachweisen. Ein hoher  $F_v/F_m$ -Wert deutet somit auf eine hohe Überlebensrate der überfluteten Pflanzen hin.

# 4.1.3. ADH-Induktion in den Blättern und $F_v/F_m$ -Werte weisen auf eine Überflutungstoleranz beider Taxa hin

Sowohl die Regulation der ADH in den Blättern als auch die gemessenen  $F_v/F_m$ -Werte im Verlauf periodischer Überflutung unter kontrollierten Bedingungen in einer Klimakammer weisen auf eine Überflutungstoleranz bei *D. cespitosa* und *D. wibeliana* hin. Die  $F_v/F_m$ -Werte der periodisch überfluteten Pflanzen liegen gleichauf mit den Werten der Kontrollpflanzen, was darauf hindeutet, dass beide Taxa die periodische Überflutung ohne starke Auswirkungen auf die photosynthetische Effektivität tolerieren. Die ADH wird bei einer initialen Überflutung zunächst nur auf Transkriptebene induziert, zeigt aber nach einer Woche periodischer Überflutung auch eine deutliche Erhöhung der Enzymaktivität. Nach drei Wochen konnte außerdem eine stark erhöhte Proteinmenge nachgewiesen werden und es zeigte sich eine Tendenz zu einer höheren ADH-Aktivität in überfluteten *D. wibeliana*-Pflanzen im Vergleich zu *D. cespitosa*. Allerdings korreliert die ADH-Aktivität nicht zwangsläufig mit der Überflutungstoleranz (Kennedy et al., 1987), der Unterschied zwischen den Taxa ist also nicht unmittelbar mit einer unterschiedlichen Überflutungstoleranz gleichzusetzen.

Im Vergleich zu anderen Studien zur Überflutungstoleranz ist eine Besonderheit der vorliegenden Studie die Untersuchung der Reaktion auf periodische Überflutung. Frühere Studien zu unterschiedlichen Arten behandeln weitgehend längere Zeiträume vollständiger oder teilweiser Überflutung (siehe bspw. Vervuren et al., 1999; Mommer et al., 2007; Pedersen et al., 2009) oder untersuchen Überflutungstoleranz indirekt über die Toleranz gegenüber Hypoxie oder Anoxie (siehe bspw. Andrews et al., 1994; Sachs et al., 1996; Yamauchi et al., 2014). Im Unterschied dazu sind die Überflutungsphasen bei der (tidebedingten) periodischen Überflutung vergleichsweise kurz (in diesem Experiment fünf Stunden), was bei Überflutung im Licht sehr niedrige pflanzeninterne Sauerstoffkonzentrationen möglicherweise verhindern Die könnte. interne Sauerstoffversorgung hängt tagsüber bei ausreichend Licht und CO<sub>2</sub> in erster Linie von der Unterwasser-Photosynthese ab (Winkel et al., 2013). Im Dunkeln dagegen hängt die Sauerstoffversorgung ausschließlich von der O<sub>2</sub>-Aufnahme aus dem Überflutungswasser ab,

108

was zu deutlich niedrigeren Sauerstoffpartialdrücken (Hypoxie) im Gewebe führt (Winkel et al., 2013).

Nach diesen hypoxischen Phasen, die insbesondere im Dunkeln auftreten, kommt es zusätzlich bei wieder einsetzendem Luftkontakt zu einem erhöhten Auftreten von ROS (Monk et al., 1987; Albrecht & Wiedenroth, 1994; Biemelt, 1998; Garnczarska & Bednarski, 2004; Garnczarska et al., 2004). Da sich diese hypoxischen Phasen und Re-Oxygenierungsphasen bei der tidebedingten periodischen Überflutung in verhältnismäßig schneller Abfolge zweimal täglich wiederholen, sind neben Anpassungen an Überflutung bzw. Hypoxie auch Anpassungen der ROS-Abwehr notwendig, um ein Überleben der Pflanzen zu gewährleisten. Im Freiland kommen neben diesen wichtigen Stressoren weitere abiotische und biotische Faktoren hinzu, die in der Summe einen multiplen Stress verursachen können. Aus diesem Grund wurde für weitere Untersuchungen ein reziprokes Verpflanzungsexperiment im Freiland durchgeführt.

### 4.2. Reziprokes Verpflanzungsexperiment im Freiland

Der Freilandversuch diente sowohl der Verifizierung der Daten aus dem Labor und somit der Überprüfung der ökophysiologischen Relevanz als auch der Untersuchung weiterer Parameter, die zuvor nicht im Labor getestet worden waren. Neben den in dieser Arbeit untersuchten Parametern, wurde von Ambroselli (2013) das Proteom beider Taxa in Reaktion auf die reziproke Verpflanzung vergleichend untersucht.

Im Hinblick auf die Anpassung an Überflutung ist bei terrestrischen Pflanzen vor allen Dingen der Gasaustausch zwischen Blättern und Überflutungswasser wichtig, da dieser sowohl bei Tageslicht als auch nachts im Dunkeln entscheidend für die interne Sauerstoffversorgung ist (Mommer et al., 2005a; Mommer & Visser, 2005; Winkel et al., 2013). Im Licht ist die CO<sub>2</sub>-Aufnahme aus dem Wasser notwendig, um die Unterwasser-Photosynthese aufrecht zu erhalten (Winkel et al., 2013) und die Photorespiration zu minimieren (Mommer et al, 2005b), da in der Dunkelphase akkumuliertes CO<sub>2</sub> nur zu einem initialen Peak des pO<sub>2</sub> in Blättern und Wurzeln führt und der pO<sub>2</sub> nach 30-60 min ein niedrigeres konstantes Niveau erreicht, dessen Höhe von der CO<sub>2</sub>-Aufnahme abhängt (siehe Abbildung 4 in Colmer & Pedersen, 2008a). In der vorliegenden Studie wurde nach Einschalten des Lichts kein initialer Peak des pO<sub>2</sub> in den Wurzeln vollständig überfluteter Pflanzen nachgewiesen (Abbildung 51). Möglicherweise ist ein solcher Peak jedoch in den Blättern der untersuchten Taxa nachweisbar, da auch bei Reis in der Studie von Colmer und Pedersen (2008a) der Peak in den Blättern stärker ausgeprägt war als in den Wurzeln. Im Gegensatz zur Situation im Licht ist im Dunkeln eine direkte O<sub>2</sub>-Aufnahme aus dem Überflutungswasser notwendig (Winkel et al., 2013). Wegen der Bedeutung des Unterwasser-Gasaustauschs wurden blattmorphologische Parameter untersucht, die potentiell den Unterwasser-Gasaustausch beeinflussen bzw. die anschließende Gasdiffusion im Pflanzeninneren optimieren.

#### 4.2.1. Entwicklung der reziprok verpflanzten Individuen im Freiland

Zunächst ist festzustellen, dass beide Taxa in der Lage sind, im Habitat des Schwestertaxons zu überleben, zumindest für neun Monate. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass der Zeitraum von neun Monaten einen Winter beinhaltete. Beide Taxa haben somit eine Überwinterung im fremden Habitat überlebt und im Frühling neue Blätter entwickelt. Auffällig ist aber, dass *D. cespitosa* in Kollmar deutlich kürzere Blätter aufweist als *D. wibeliana*, was auf einen Entwicklungsrückstand des Taxons im tidebeeinflussten Habitat hinweist.

Trotz des Überlebens scheint an beiden Standorten das jeweils heimische Taxon nach neun Monaten über eine größere Biomasse zu verfügen (Abbildung 15). Für die verpflanzten Individuen im Krempermoor liegen zur Biomasse leider keine Daten vor. Die Ergebnisse der Deckung in Kollmar neun Monate nach der Verpflanzung zeigen jedoch eine mehr als siebenmal höhere Deckung von *D. wibeliana* im Vergleich zu *D. cespitosa* (Abbildung 40) und unterstützen somit den optischen Eindruck. Auch Heydel (2008) konnte in einem fünfmonatigen Experiment in einer Tidesimulationsanlage im Freien zeigen, dass *D. cespitosa* in Reaktion auf periodische Überflutung (zweimal täglich 5,6 h) eine signifikant niedrigere Biomasse ausbildet als nicht überflutete Kontrollpflanzen. Im Gegensatz dazu wies in der Studie *D. wibeliana* in der Variante ohne Überflutung eine signifikant niedrigere Biomasse auf als in der periodischen Überflutung.

Besonders interessant ist die Entwicklung der verpflanzten Individuen am Standort Kollmar (Abbildung 14). Bereits nach einer Woche beginnen die Blätter von *D. cespitosa* dort abzusterben. Auffällig ist auch, dass die Blätter stark abgeknickt sind, während dies bei *D. wibeliana* nicht der Fall ist. Das Absterben der Blätter setzt sich in Woche zwei und drei fort, sodass nach drei Wochen alle ursprünglich verpflanzten Blätter tot sind. Jedoch entwickeln sich nach drei Wochen bereits neue Blätter, die über eine veränderte Morphologie verfügen. Zum einen sind diese Blätter flexibler und knicken nicht mehr ab, zum anderen sind sie weniger hart und verfügen über weniger Stachelhaare (Ambroselli, 2013). Nach drei

Wochen waren die neugebildeten Blätter noch nicht voll entwickelt, weshalb eine weitere detaillierte Untersuchung der Blattmorphologie nach sechs Wochen und einem deutlichen Wachstum dieser neuen Blätter durchgeführt wurde.

Damit kann die in Abschnitt 1.7. gestellte Fragestellung 4) "Sind beide Taxa in der Lage, im Habitat des jeweils anderen Taxons zu überleben?" positiv beantwortet werden. Beide Taxa sind zumindest für neun Monate in der Lage, im fremden Habitat zu überleben.

# 4.2.2. Veränderung der Blattmorphologie in Anpassung an unterschiedliche Habitate

Die spezifische Blattfläche (SLA) ist in den neugebildeten Blättern von *D. cespitosa* am Standort Kollmar nach drei Wochen deutlich erhöht, sowohl im Vergleich zu *D. cespitosa*-Individuen am heimischen Standort Krempermoor, als auch im Vergleich zu *D. wibeliana* an beiden Standorten (Abbildung 27). Diese neuen Blätter waren jedoch noch nicht voll entwickelt und eine hohe SLA ist unter anderem auch ein charakteristisches Merkmal junger Blätter (Cooke et al., 1984). Nach sechs Wochen ist die SLA in den neu entwickelten Blättern leicht gesunken, liegt aber immer noch deutlich über den Werten der anderen drei Varianten. Auch die neugebildeten Blätter nach der Überwinterung, neun Monate nach der Verpflanzung, weisen eine deutlich höhere SLA auf (Abbildung 27). Die Erhöhung der SLA scheint somit nicht ausschließlich auf das Alter der Blätter zurückzuführen zu sein, sondern ist auch eine Reaktion auf die Umweltbedingungen am Standort Kollmar.

Es ist bekannt, dass sowohl überflutungstolerante als auch intolerante terrestrische Arten die SLA in Blättern, die während einer vollständigen Überflutung unter Wasser gebildet werden, erhöhen. Für Eudikotyledonen wurde diese Reaktion unter anderem bei *Rumex palustris* und *Rumex crispus* nachgewiesen (Vervuren et al., 1999; Mommer et al., 2005a, 2005b, 2007). Außerdem konnten Vervuren et al. (1999) diese Reaktion in der Monokotyledonen *Phalaris arundinacea* nachweisen, die wie *Deschampsia* der Familie der Poaceaen angehört. Da diese Reaktion auch bei intoleranten Arten nachgewiesen werden konnte (Mommer et al., 2007), ist dies kein direkter Hinweis auf eine Überflutungstoleranz von *D. cespitosa*, sondern wird von Mommer et al. (2007) als eine Grundvoraussetzung für eine mögliche Toleranz beschrieben. Der Vorteil einer höheren SLA bei Überflutung liegt darin, dass eine höhere relative Oberfläche in Kontakt mit dem Überflutungswasser steht. Es steht somit pro Biomasseeinheit mehr Oberfläche zum Gasaustausch zur Verfügung und die Blätter verfügen über eine höhere Kapazität zum diffusiven Unterwasser-Gasaustausch

(Mommer et al., 2005a). Eine Besonderheit der vorliegenden Studie ist jedoch, dass *D. cespitosa* diese Erhöhung der SLA in Reaktion auf kurze, zweimal täglich wiederkehrende Überflutungsereignisse zeigt, im Unterschied zu längeren Überflutungszeiträumen in früheren Studien (30 Tage: Vervuren et al., 1999; 12 Tage: Mommer et al., 2005a). Nach Wissen des Autors liefert die vorliegende Studie den ersten Nachweis einer Erhöhung der SLA in Reaktion auf periodische Überflutung.

Um detailliertere Informationen über die Veränderungen der neugebildeten Blätter in Reaktion auf periodische Überflutung zu gewinnen, ist es interessant zu untersuchen, wodurch die erhöhte SLA zustande kommt. Da die SLA durch Division der Blattfläche durch die Trockenmasse berechnet wird (Poorter et al., 2009), können sowohl Änderungen der Blattfläche als auch der Trockenmasse zu einer Veränderung der SLA führen. Dabei können Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der Blätter wichtig sein, wie z.B. der Anteil nicht-struktureller Kohlenhydrate (NSC, engl. nonstructural carbohydrates). Mommer et al. (2005b) konnten zeigen, dass die Akkumulation von NSC einen Großteil des Unterschieds in der SLA zwischen überfluteten und nicht überfluteten Rumex-Blättern ausmachte. Der Anteil von Stärke an der Blatttrockenmasse kann 30-40 % erreichen (McDonald et al., 1986; Rufty et al., 1988), was zu einem deutlichen Herabsenken der SLA führt. Neben Unterschieden in der chemischen Zusammensetzung können auch Veränderungen der Morphologie zu einer höheren SLA führen, wie schwächer ausgeprägtes Palisadenparenchym in Schattenblättern (Björkman, 1981), ein geringerer Anteil an Sklerenchym (Pammenter et al., 1986) oder eine größere Zellgröße (Lambers & Poorter, 1992). Außerdem können Veränderungen in der Ausbildung von Blatthaaren, Dornen oder ähnlichen Strukturen zu einer veränderten SLA führen (Lambers & Poorter, 1992).

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen in der vorliegenden Studie zeigen, dass die neugebildeten Blätter von *D. cespitosa* am Standort Kollmar nach sechs Wochen dünner sind als die Blätter im Krempermoor (Abbildung 35), was einen Teil der höheren SLA erklären kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese geringere Blattdicke nicht durch ein geringeres Streckungswachstum der Zellen zustande kommt, da auch die Anzahl der adaxialen Epidermiszellen in diesen Blättern deutlich abnimmt (Abbildung 37). Die Blattporosität ist in den neu entwickelten Blättern tendenziell eher niedriger (Abbildung 29), was bedeutet, dass der Anteil gasgefüllter Räume im Blattgewebe tendenziell niedriger ist und somit die SLA eher herabgesenkt wird. Möglicherweise ist eine stärkere Akkumulation von NSC in den Blättern der nicht überfluteten *D. cespitosa*-Pflanzen und in den *D. wibeliana*-

Blättern für die niedrigere SLA im Vergleich zu den neuen *D. cespitosa*-Blättern verantwortlich. *D. cespitosa* ist aufgrund des Stresses in Kollmar unter Umständen nicht in der Lage, Speicherkohlenhydrate anzulegen, was zu einer Abnahme der Trockenmasse pro Blattflächeneinheit und damit einer höheren SLA führen würde. Mommer et al. (2005b) konnten diesen Effekt bei *Rumex palustris* nachweisen. Ambroselli (2013) fand in rasterelektronenmikroskopischen (REM) Aufnahmen der Blattoberflächen beider Taxa außerdem Hinweise auf eine Abnahme der Stachelhaare auf der Blattoberfläche der neugebildeten *D. cespitosa*-Blätter, was auch zu einer Erhöhung der SLA beitragen würde.

Die Kapazität zum diffusiven Gasaustausch ist möglicherweise generell bei *D. cespitosa* höher als bei *D. wibeliana*, da das Verhältnis von Blattoberfläche zu Blattvolumen nach sechs Wochen an beiden Standorten bei *D. cespitosa* höher ist (Abbildung 38). Jedoch ist für einen effektiven diffusiven Unterwasser-Gasaustausch nicht nur die Blattoberfläche, die in Kontakt mit dem Überflutungswasser steht, von Bedeutung. Frost-Christensen et al. (2003) nehmen an, dass die größte Limitation der Gasdiffusion zwischen Blatt und Wasser von der Cuticula ausgeht. Eine effektive Akklimatisierung an Überflutung kann somit möglicherweise durch einen reduzierten cuticulären Diffusionswiderstand erreicht werden (Mommer et al., 2004). Mommer et al. (2005b) konnten zeigen, dass in Blättern, die unter Wasser gebildet wurden, die Zellwanddicke der Epidermis und die Cuticuladicke abnehmen. In weiteren Studien zur Anpassung der beiden *Deschampsia*-Taxa an periodische Überflutung wäre somit eine Untersuchung der Cuticula von großem Interesse. Dabei sollte jedoch nicht nur die Dicke der Cuticula untersucht werden, da auch die chemische Zusammensetzung der cuticulären Wachse den Diffusionswiderstand stark beeinflusst (Frost-Christensen et al., 2003).

Neben dem diffusiven Gasaustausch ist aber auch eine  $CO_2$ - und  $O_2$ -Aufnahme über die Stomata unter Wasser möglich, wenn die Pflanzen beim Untertauchen einen Gasfilm auf der Blattoberfläche ausbilden (Verboven et al., 2014). Beide untersuchten Taxa verfügen über Gasfilme, die sich jedoch zum Teil in der Dicke und damit auch dem Gasvolumen unterscheiden. In Kollmar sinkt die Gasfilmdicke nach sechs Wochen insbesondere bei *D. cespitosa* stark ab, erreicht nach neun Monaten aber wieder das gleiche Level wie *D. wibeliana* (Abbildung 28). Da sich Gasfilme unter Wasser auf stark hydrophoben Oberflächen bilden (Pedersen & Colmer, 2012; Verboven et al., 2014), wurde auch die Blatthydrophobizität im Verlauf des Verpflanzungsexperiments untersucht.

Die Blatthydrophobizität ist auf der adaxialen Seite bei beiden Taxa mit Kontaktwinkeln von  $\theta > 120^{\circ}$  generell hoch (Abbildung 31) und auf der abaxialen Blattseite generell niedrig

 $(\theta < 90^{\circ}; \text{Abbildung 32})$ . Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass sich bei beiden Taxa nur auf der adaxialen Blattseite ein Gasfilm bildet. Nach Crisp (1963) gelten zwar erst Oberflächen mit einem Kontaktwinkel  $\theta > 130^{\circ}$  als nicht benetzbar, jedoch auch erst mit  $\theta < 110^{\circ}$  als benetzbar. Die adaxialen Kontaktwinkel von  $\theta > 120^{\circ}$  weisen also eher auf nicht benetzbare (stark hydrophobe) Oberflächen hin, auch wenn nicht alle Werte Kontaktwinkel > 130^{\circ} aufweisen. Eine Ausnahme stellt der Wert nach sechs Wochen bei den neugebildeten *D. cespitosa*-Blättern in Kollmar dar, der auf der adaxialen Seite auf  $\theta = 70^{\circ}$  sinkt (Abbildung 31). Auch auf der abaxialen Blattseite sinkt die Hydrophobizität von 72^{\circ} nach drei Wochen auf 47^{\circ} nach sechs Wochen (Abbildung 32). Die niedrigere Blatthydrophobizität geht mit der im vorherigen Absatz beschriebenen Abnahme der Gasfilmdicke einher, was den Zusammenhang zwischen den beiden Parametern verdeutlicht.

Jedoch sind trotz der sehr geringen Blatthydrophobizität (und damit möglichen Benetzbarkeit der Oberfläche) noch Gasfilme messbar (26 µm Gasfilmdicke; Abbildung 28). Das stellt aber nicht grundsätzlich den Zusammenhang zwischen Hydrophobizität und Ausbildung eines Gasfilms in Frage, da dieser Umstand auch auf inhomogene Blattoberflächen zurückzuführen sein könnte. Die Blatthydrophobizität wurde durch einen 5 mm<sup>3</sup> Wassertropfen jeweils nur an einer Stelle des Blattes gemessen, während die Gasfilmdicke für jedes Blatt über eine Blattlänge von 5 cm bestimmt wurde und somit die mittlere Gasfilmdicke über diese Blattlänge darstellt. Somit kann durchaus eine sehr niedrige Blatthydrophobizität in einem Bereich des Blattes gemessen werden und sich an anderer Stelle auf der Blattspreite trotzdem ein Gasfilm bilden.

Gasfilme auf der Blattoberfläche stellen eine wichtige Anpassung terrestrischer Pflanzen an Überflutung dar, da sie den Unterwasser-Gasaustausch verbessern und die Unterwasser-Photosyntheserate erhöhen (Colmer & Pedersen, 2008b; Pedersen et al., 2009; Colmer et al., 2011; Winkel et al., 2011; Pedersen & Colmer, 2012; Winkel et al., 2014). Sie ermöglichen einen stomatären Gasaustausch unter Wasser und erhöhen dadurch den internen pO<sub>2</sub> (Verboven et al., 2014), entweder direkt durch O<sub>2</sub>-Aufnahme im Dunkeln oder indirekt über CO<sub>2</sub>-Aufnahme und Unterwasser-Photosynthese im Licht (Colmer & Pedersen, 2008a; Pedersen et al., 2009), solange die Stomata auch nur leicht geöffnet sind (Verboven et al., 2014). Auch geringe Unterwasser-Photosyntheseraten können ein Überleben der überfluteten Pflanzen sichern, indem O<sub>2</sub> und Assimilate bereitgestellt werden (Colmer et al., 2014). Bereits geringe Lichtintensitäten führen dabei zu einer erhöhten Überlebensrate überfluteter Pflanzen (Mommer & Visser, 2005). Das verdeutlicht die Bedeutung der Unterwasser-Photosynthese für das Überleben überfluteter terrestrischer Pflanzen. Auch D. cespitosa und D. wibeliana sind in der Lage, unter Wasser Photosynthese zu betreiben und dadurch den internen  $pO_2$  zu erhöhen (Abbildung 47 und 52).

Die niedrigere Gasfilmdicke der neugebildeten D. cespitosa-Blätter am tidebeeinflussten Standort Kollmar stellt somit einen (möglicherweise erheblichen) Nachteil für die Überflutungstoleranz dar. Diese geringe Gasfilmdicke und Blatthydrophobizität war jedoch nach neun Monaten nicht mehr messbar (Abbildung 28). Diese neugebildeten Blätter weisen demnach nicht grundsätzlich eine niedrigere Hydrophobizität und Gasfilmdicke auf. Möglicherweise beeinflussen also weitere Faktoren, wie z. B. das Blattalter, die Ausbildung eines Gasfilms. Die Untersuchungen nach neun Monaten wurden Ende Mai durchgeführt und D. cespitosa zeigte am Standort Kollmar einen deutlichen Entwicklungsrückstand im Vergleich zu D. wibeliana (Abbildung 15). Die untersuchten D. cespitosa-Blätter nach neun Monaten waren möglicherweise noch in einem früheren Entwicklungsstadium und es ist denkbar, dass diese Blätter mit fortschreitendem Alter die hohe Hydrophobizität ebenfalls nicht aufrecht erhalten können. Die Faktoren und Mechanismen, die eine Degradierung des Gasfilms beeinflussen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt und bedürfen weiterer Studien (Winkel et al., 2014). Armstrong et al. (2009) konnten aber zeigen, dass Paraffinöl und Diesel ein Verschwinden des Gasfilms auf Blättern und Sprossen von Phragmites australis verursachen. Somit könnten auch Wasserverunreinigungen der Elbe für die niedrigere Blatthydrophobizität nach sechs Wochen verantwortlich sein. Dafür spricht auch, dass nach sechs Wochen in Kollmar auch die adaxiale Blatthydrophobizität bei D. wibeliana sinkt (von  $\theta = 130^{\circ}$  nach drei Wochen auf 110°; Abbildung 31).

Neun Monate nach der reziproken Verpflanzung im Freiland gibt es keine Unterschiede in der Blattdicke, Blattbreite und Anzahl adaxialer Epidermiszellen mehr, weder zwischen den Taxa noch zwischen den beiden Standorten (Abbildung 35, 36 und 37). Auch das Verhältnis von Blattoberfläche zu –volumen ist nach neun Monaten bei beiden Taxa nahezu gleich (Abbildung 38). Im Gegensatz dazu ist die SLA zu diesem Zeitpunkt in den neugebildeten *D. cespitosa*-Blättern immer noch deutlich höher (Abbildung 27). Da es in der Blattmorphologie keine großen Unterschiede mehr gibt, deutet die höhere SLA auf geringere Mengen an NSC hin. Um dies zu bestätigen, sind aber weitere Studien nötig, in denen auch Stärke- und Saccharosekonzentrationen in den Blättern bestimmt werden. Daraus kann dann die NSC-freie SLA berechnet werden (Mommer et al., 2005b), die besseren Aufschluss über Veränderungen der Blattmorphologie gibt.

## Diskussion

Die auffälligste Entwicklung bei der Blattmorphologie stellt die höhere SLA der neugebildeten *D. cespitosa*-Blätter am Standort Kollmar dar, an dem die Pflanzen zweimal täglich überflutet wurden. Dieser höhere SLA bleibt über die gesamte Dauer des Experiments erhalten und konnte an allen drei Messzeitpunkten (nach drei Wochen, sechs Wochen und neun Monaten) nachgewiesen werden (Abbildung 27). Eine Erhöhung der SLA in Reaktion auf Überflutung wurde bereits in früheren Studien gefunden (Vervuren et al., 1999; Mommer et al., 2005a, 2005b, 2007). Mommer et al. (2005b) bezeichneten diese während der Überflutung gebildeten Blätter mit einer höheren SLA als "aquatische Blätter", im Kontrast zu den an der Luft gebildeten "terrestrischen Blättern". Winkel et al. (2013) bezeichneten diese Blätter als "semi-aquatisch". Da es sich bei dem tidebeeinflussten Standort Kollmar, an dem die neuen Blätter gebildet wurden, um keinen aquatischen sondern eher einen semiaquatischen Lebensraum handelt, soll hier der Bezeichnung nach Winkel et al. (2013) gefolgt werden. Diese neugebildeten *D. cespitosa*-Blätter können somit als "semi-aquatische" Blätter bezeichnet werden und stellen möglicherweise einen spezifische Akklimatisierung an die Überflutung dar.

Die im Abschnitt 1.7. gestellte Fragestellung 5) "Sind Akklimatisierungsreaktionen in Bezug auf die Blattmorphologie nach Verpflanzung ins fremde Habitat nachweisbar?" kann für D. wibeliana negativ beantwortet werden. D. wibeliana zeigt kaum Akklimatisierungsreaktionen nach Verpflanzung ins fremde Habitat oder nach Ausbleiben der periodischen Überflutung. Bei D. cespitosa wurden hingegen blattmorphologische Akklimatisierungen nachgewiesen. Insbesondere die SLA war bei den periodisch überfluteten Pflanzen erhöht. Dennoch weist auch D. wibeliana vorteilhafte Blattmerkmale wie eine hohe Gasfilmdicke auf. Damit kann Fragestellung 6) "Weist D. wibeliana spezifische Anpassungen der Blattmorphologie auf?" beantwortet werden. D. wibeliana weist spezifische Anpassungen auf, die bei Überflutung vorteilhaft sind.

# 4.2.3. ADH-Aktivität in Blättern reziprok verpflanzter Individuen im Freiland

In Laborversuchen wurde bei beiden Taxa eine signifikante Erhöhung der ADH-Aktivität in den Blättern nach drei Wochen periodischer Überflutung unter kontrollierten Bedingungen nachgewiesen (siehe Abschnitt 3.1.1. im Kapitel Ergebnisse). Außerdem wurde eine Tendenz zu einer höheren ADH-Aktivität bei *D. wibeliana* gefunden. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse unter dem Einfluss multipler Faktoren an natürlichen Standorten im Freiland wurde die ADH-Aktivität in den Blättern auch im reziproken Verpflanzungsexperiment im Verlauf von sechs Wochen gemessen.

Im Freiland ist zunächst festzustellen, dass auch hier beide Taxa in den Blättern periodisch überfluteter Pflanzen am Standort Kollmar deutliche höhere ADH-Aktivitäten aufweisen als in den nicht überfluteten Pflanzen im Krempermoor (Abbildung 16). Im Krempermoor liegen die Werte nach ein und zwei Wochen, insbesondere bei *D. wibeliana*, noch etwas höher (10-12 nkat mg<sup>-1</sup>), sinken nach drei Wochen stark ab und bleiben auch nach vier und sechs Wochen zwischen 2 und 4 nkat mg<sup>-1</sup>. Die höheren ADH-Aktivitäten in den nicht überfluteten *D. wibeliana*-Blättern in den ersten zwei Wochen des Experiments zeigen, dass die Kapazität zur fermentativen Energiegewinnung nur langsam reduziert wird, wenn die Pflanzen keiner Überflutung mehr ausgesetzt sind. Vor der reziproken Verpflanzung wurden die Pflanzen aus dem Freiland entnommen und eine Woche ohne Überflutung im Freien kultiviert. Demnach reguliert *D. wibeliana* die Fermentationskapazität erst drei bis vier Wochen nach Beenden der periodischen Überflutung auf ein konstant niedriges Level von 2 bis 4 nkat mg<sup>-1</sup>.

In Kollmar ist die ADH-Aktivität zunächst bei *D. cespitosa* höher, nach sechs Wochen kehrt sich dieses Verhältnis jedoch um und *D. wibeliana* weist eine signifikant höhere ADH-Aktivität in den Blättern auf (Abbildung 16). Während die Werte nach einer Woche tendenziell bei *D. cespitosa* höher sind, liegen sie nach zwei, drei und vier Wochen bei beiden Taxa etwa gleichauf. Nach sechs Wochen hingegen steigt die ADH-Aktivität bei *D. wibeliana* stark an und sinkt bei *D. cespitosa* stark ab, sodass es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Taxa gibt. Interessanterweise geht diese Veränderung mit der Entwicklung neuer *D. cespitosa*-Blätter einher. Die im Abschnitt 4.2.2. beschriebenen neugebildeten "semi-aquatischen" Blätter von *D. cespitosa* waren erst nach sechs Wochen somit schließen, dass die "semi-aquatischen" Blätter von *D. cespitosa* eine signifikant niedrigere Kapazität zur fermentativen Energiegewinnung aufweisen.

Die niedrigere ADH-Aktivität in den "semi-aquatischen" *D. cespitosa*-Blättern deutet auf eine verbesserte O<sub>2</sub>-Versorgung während der Überflutungsphasen hin, da die ADH-Aktivität in der Literatur als Hypoxie-Marker beschrieben wird (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Strommer, 2011). In fünf dikotylen Arten konnten Mommer et al. (2007) nachweisen, dass die an Überflutung angepassten "aquatischen Blätter" höhere O<sub>2</sub>-Level in den Blattstielen aufwiesen als die nicht angepassten "terrestrischen Blätter".

## Diskussion

Die erhöhte ADH-Aktivität bei *D. wibeliana* nach sechs Wochen lässt sich durch die Überflutungsdauer erklären. Von Woche zwei bis sechs gibt es einen statistisch signifikanten positiven Zusammenhang zwischen der Gesamtüberflutungsdauer der jeweiligen Woche und der ADH-Aktivität in den Blättern von *D. wibeliana*, während es diesen Zusammenhang bei *D. cespitosa* nicht gibt (Abbildung 17). Für ununterbrochene Hypoxiephasen konnte bereits nachgewiesen werden, dass die ADH-Aktivität über längere Zeiträume (48 h) ansteigt (Andrews et al., 1994) und somit positiv mit der Hypoxieexponierung korreliert. Im Fall der periodischen Überflutung kann davon ausgegangen werden, dass mit steigender Gesamtüberflutungsdauer pro Woche auch der hypoxische Stress zunimmt. Das spricht für eine Korrelation zwischen Hypoxieexponierung und ADH-Aktivität. Nach Wissen des Autors ist dies die erste Studie, die diesen Zusammenhang auch für unterbrochene Hypoxiephasen in Form von periodischer Überflutung zeigt.

#### Vergleich der ADH-Aktivitäten verpflanzter und unbeeinflusster Individuen

Die Messung der ADH-Aktivität in den Blättern unbeeinflusster Pflanzen beider Taxa am jeweils heimischen Standort zeigt einen signifikanten Effekt der Verpflanzung in Kollmar, nicht jedoch im Krempermoor. Die verpflanzten *D. wibeliana*-Individuen in Kollmar weisen signifikant höhere Werte auf als die unbeeinflussten *D. wibeliana*-Pflanzen (Abbildung 18). Das deutet darauf hin, dass durch den Vorgang der Verpflanzung, auch innerhalb des natürlichen Standorts, zusätzlicher Stress auftritt, der zu einer weiteren Erhöhung der ADH-Aktivität führt. Denn neben Hypoxie können auch andere abiotische Stressoren zu einer Induktion der *Adh* führen (Dolferus et al., 1994; de Bruxelles et al., 1996; Kürsteiner et al., 2003). Dennoch liegen die Werte der unbeeinflussten *D. wibeliana*-Pflanzen deutlich höher als die der Pflanzen im Krempermoor, was die ökophysiologische Relevanz der erhöhten ADH-Aktivität in den Blättern verdeutlicht. Im Krempermoor gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen verpflanzten und unbeeinflussten *D. cespitosa*-Individuen. Beide Gruppen weisen außerdem deutlich niedrigere ADH-Aktivitäten auf als die Pflanzen in Kollmar (Abbildung 18).

### Vergleich der ADH-Aktivitäten im Freiland mit den Laborergebnissen

Die Werte der periodisch überfluteten Pflanzen in Kollmar liegen mit Werten bis zu 33 nkat mg<sup>-1</sup> deutlich höher als die der periodisch überfluteten Pflanzen im Laborversuch (7-11 nkat mg<sup>-1</sup>; vgl. Abbildung 9 mit 16). Die ADH-Aktivität ist im Freiland höher, obwohl die Überflutungsdauer dort mit durchschnittlich 3,1 h deutlich kürzer ist als im Laborversuch mit 5 h. Ein Grund dafür könnte multipler abiotischer Stress im Freiland sein, der zu einer stärkeren Erhöhung der ADH-Aktivität führt, da z. B. auch Dehydrierung und niedrige Temperaturen zu einer *Adh*-Induktion führen (Dolferus et al., 1994; de Bruxelles et al., 1996; Kürsteiner et al., 2003). Möglicherweise kam es im Freilandversuch aber auch zu einer stärkeren Ausprägung der Hypoxie durch eine deutlich niedrigere O<sub>2</sub>-Produktion unter Wasser, bedingt durch eine geringere Lichtverfügbarkeit.

Überflutungswasser hat häufig eine hohe Trübung (Colmer et al., 2011) und damit eine hohe Lichtabsorption und -streuung. In der Elbe wurden für den Bereich flussaufwärts der "Turbidity Maximum Zone" (TMZ), in dem auch der Versuchsstandort Kollmar liegt, Schwebstoffkonzentrationen (SSC, engl. suspended sediment concentration) zwischen 112 mg L<sup>-1</sup> im Sommer nachgewiesen (Papenmeier et al., 2014). Im und 121 Untersuchungszeitraum vom 09.08.2012 bis zum 20.09.2012 weisen die Daten der FGG-Elbe für die Messstelle, die am dichtesten am Versuchsstandort Kollmar liegt (Messstelle Grauerort, Strom-km 660,6), eine mittlere Trübung von 62 FNU nach. In Verbindung mit den Überflutungshöhen von bis zu 169 cm (Mittelwert: 81 cm; siehe Abschnitt 3.2.1. im Kapitel Ergebnisse) führt die hohe Trübung höchstwahrscheinlich zu einer geringeren Lichtverfügbarkeit im Vergleich zu den ca. 200 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> im Laborversuch. Das hat wiederum eine niedrigere Unterwasser-Photosyntheseleistung und damit eine geringere O<sub>2</sub>-Produktion zur Folge. Das et al. (2009) konnten zeigen, dass eine hohe Trübung des Überflutungswassers die Sauerstoffkonzentration im Wasser senkt, zu einem Abbau der Speicherkohlenhydrate und letztendlich zu einer erhöhten Mortalität der überfluteten Pflanzen führt. Dies ist somit ein weiterer Hinweis darauf, dass die höhere SLA in den "semiaquatischen" Blättern von D. cespitosa durch eine niedrigere Konzentration von NSC erklärt werden kann.

# 4.2.4. Regulation der Photosynthese in reziprok verpflanzten Individuen beider Taxa im Freiland

Die Regulation der Photosynthese wurde im Verlauf reziproken des Verpflanzungsexperiments untersucht, da bekannt ist, dass der Photosyntheseapparat und insbesondere das PS II sensitiv für eine Vielzahl von Stressoren ist (Baker, 2008; Ashraf & Harris, 2013). Außerdem kann das PS II zeitlich begrenzt inhibiert werden, bevor irreversible Schäden in der Zelle auftreten (Force et al., 2003; Haldimann & Feller, 2004). Somit eignet sich die Regulation des PS II, die über die Chlorophyllfluoreszenz gemessen werden kann, um die Reaktion auf unterschiedliche Stressoren zu untersuchen und den Stresszustand der Pflanzen zu bestimmen (Force et al., 2003). Force et al. (2003) weisen außerdem auf die

Vorteile der Messung einer Vielzahl von Fluoreszenz-Parametern hin. In der Studie von Force et al. (2003) wies der F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>-Wert die geringste Sensitivität gegenüber Stress auf. Deshalb wurde in der vorliegenden Untersuchung im Freiland neben der F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>-Messung auch eine Quenching-Analyse durchgeführt, die Aufschluss über die Verwertung der absorbierten Energie über photochemisches Quenching ( $\Phi_{PSII}$ ), reguliertes nichtphotochemisches Quenching  $(\Phi_{NPO})$  und nicht reguliertes nichtphotochemisches Quenching  $(\Phi_{NO})$  gibt al., 2004; Kramer et al., 2004). (Hendrickson et Außerdem wurden die Lichtsättigungseigenschaften beider Taxa untersucht, um Informationen über die Anpassung des Photosyntheseapparats an die vorherrschenden Lichtbedingungen im Freiland zu erhalten.

#### Lichtsättigungseigenschaften beider Taxa im Krempermoor nach zwei Wochen

Die Lichtsättigungseigenschaften deuten auf eine höhere Photosynthesekapazität bei D. cespitosa und eine höhere Photosyntheseeffizienz bei D. wibeliana hin. Es gibt zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen den Arten, aber deutliche Tendenzen zu einer höheren maximalen Elektronentransportrate (ETR<sub>max</sub>) und einem höheren Lichtsättigungspunkt ( $E_k$ ) bei *D. cespitosa* und einer höheren initialen Steigung der Lichtsättigungskurve ( $\alpha$ ) bei D. wibeliana (Abbildung 19). Das deutet auf Anpassungen an unterschiedliche Lichtregime bei beiden Taxa hin. Der E<sub>k</sub>, die Lichtintensität bei der die Lichtsättigung einsetzt (Talling, 1957), und die ETR<sub>max</sub>, die die Kapazität der Photosysteme zur Nutzung der absorbierten Energie angibt (Marshall et al., 2000), sind höher in Blättern, die an hohe Lichtintensitäten angepasst sind (Sonnenblätter; Boardman, 1977), im Vergleich zu Blättern, die an niedrige Lichtintensitäten angepasst sind (Schattenblätter; Boardman, 1977). Der α-Wert hingegen, der ein Maß für die maximale photosynthetische Effizienz darstellt (Ritchie, 2008), liegt in Sonnen- und Schattenblättern entweder gleichauf oder ist in den Schattenblättern höher (Boardman, 1977). Somit scheint D. cespitosa eher an hohe Lichtintensitäten angepasst zu sein und D. wibeliana eher an niedrigere Lichtintensitäten. Das lässt sich im Hinblick auf die unterschiedlichen natürlichen Habitate beider Taxa erklären. Während es im Krempermoor, dem natürlichen Standort von D. cespitosa, zu keiner starken Verschattung der Gräser durch andere Pflanzen kommt, sind die D. wibeliana-Pflanzen an ihrem natürlichen Standort in Kollmar während der Überflutungsphasen täglich niedrigeren Lichtintensitäten ausgesetzt. Interessanterweise sind drei Wochen (eine Woche Kultivierung im Freien und anschließend zwei Wochen im Krempermoor) nicht ausreichend, um eine Akklimatisierung der D. wibeliana-Blätter an höhere Lichtintensitäten zu erreichen. Möglicherweise liegt bei D. wibeliana eine genetisch bedingte Adaptation an niedrigere Lichtintensitäten vor.

#### Stresszustand der reziprok verpflanzten Individuen im Freiland

Nach drei Wochen zeigen sich noch keine deutlichen Effekte der Verpflanzung auf den  $F_v/F_m$ -Wert (Abbildung 21). Nach vier Wochen hingegen zeigt insbesondere *D. wibeliana* im fremden Habitat (Krempermoor) eine deutliche Stressreaktion durch einen signifikant reduzierten  $F_v/F_m$ -Wert im Vergleich zu *D. wibeliana* in Kollmar (Abbildung 20). Eine signifikante Interaktion zwischen Standort und Taxon zeigt außerdem, dass beide Taxa jeweils im fremden Habitat gestresst sind (niedrigere  $F_v/F_m$ -Werte). Bei *D. cespitosa* ist der Unterschied zwischen beiden Standorten jedoch nicht signifikant. Im Vergleich der beiden Versuchsstandorte zeigt sich, dass jeweils das heimische Taxon höhere  $F_v/F_m$ -Werte aufweist. Aber nur in Kollmar ist der Unterschied zwischen beiden Standorten jedoch nicht signifikant.

Nach sechs Wochen zeigen beide Taxa im jeweils fremden Habitat eine deutliche Stressreaktion durch herabgesenkte  $F_v/F_m$ -Werte (Abbildung 21). Bei *D. wibeliana* lässt sich das Absinken der Werte im Krempermoor mit dem Auftreten eines starken Pilzbefalls zu diesem Zeitpunkt erklären, der signifikant stärker die Blätter von *D. wibeliana* befallen hatte als die von *D. cespitosa* (Abbildung 39). Nach der Überwinterung nach neun Monaten konnte kein Pilzbefall mehr festgestellt werden und der  $F_v/F_m$  erreicht auch wieder die Werte von *D. cespitosa* im Krempermoor und *D. wibeliana* in Kollmar (Abbildung 21). Interessant ist, dass die "semi-aquatischen" Blätter von *D. cespitosa* in Kollmar (siehe dazu auch Abschnitt 4.2.2.) sowohl nach sechs Wochen als auch nach neun Monaten niedrigere  $F_v/F_m$ -Werte aufweisen. Diese herabgesenkten  $F_v/F_m$ -Werte weisen auf eine Photoinhibition in den Blätter hin (Björkman & Demmig, 1987) und können auch ein Hinweis auf eine geringere Überlebensrate sein (Sarkar & Bhattacharjee, 2011). Die Akklimatisierung der Blätter im tidebeeinflussten Habitat ist zur Stressvermeidung also offenbar nicht ausreichend.

#### Effektivität der Photosynthese (Quenching-Analyse)

Die Ergebnisse der Quenching-Analyse im Rahmen von Lichtinduktionskurven zeigen starke Stresssymptome und eine herabgesenkte Photosynthese-Effizienz bei *D. wibeliana* nach sechs Wochen im Krempermoor. Zum einen ist der  $\Phi_{PSII}$  deutlich niedriger als bei *D. wibeliana* in Kollmar und als bei *D. cespitosa* (Abbildung 22). Das bedeutet, dass ein geringerer Anteil der von PS II-assoziierten Antennen absorbierten Photonen für die Photochemie genutzt wird (Kramer et al., 2004). Zum anderen ist der  $\Phi_{NPQ}$  und auch der NPQ deutlich erhöht (Abbildung 23 und 26), was beides eine erhöhte Wärmedissipation anzeigt (Kramer et al., 2004). Die Regulation der Photosysteme schützt die Pflanzen somit vor überschüssiger Energie durch eine Xanthophyll-regulierte thermische Energieentwertung, die

über eine Ansäuerung des Thylakoidlumens induziert wird (Hendrickson et al., 2004; Eberhard et al., 2008). Jedoch ist auch der  $\Phi_{NO}$  im Vergleich zu *D. cespitosa* im Krempermoor erhöht, was auf eine ineffizientere photochemische Energienutzung hinweist und aufzeigt, dass *D. wibeliana* zu diesem Zeitpunkt im Krempermoor bereits bei der eingestrahlten PAR von 357 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> nicht mehr in der Lage ist, die überschüssige absorbierte Energie vollständig durch regulierte Dissipationsprozesse zu entwerten (Kramer et al., 2004). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>-Messung (siehe oben: Abschnitt Stresszustand der reziprok verpflanzten Individuen im Freiland) und kann, wie im genannten Abschnitt diskutiert, durch den starken Pilzbefall der *D. wibeliana*-Blätter im Krempermoor erklärt werden.

Auch D. cespitosa zeigt im fremden Habitat starke Stressreaktionen, jedoch im Gegensatz zu D. wibeliana an allen drei Messzeitpunkten. Im Vergleich zum Krempermoor weist D. cespitosa in Kollmar niedrigere  $\Phi_{PSII}$ -Werte auf (Abbildung 22). Die geringere photochemische Quantenausbeute wird aber nicht durch eine höhere regulierte Energieentwertung ausgeglichen, da der  $\Phi_{\rm NPO}$  an beiden Standorten etwa gleich hoch ist (Abbildung 23). Vielmehr steigt, insbesondere nach sechs Wochen und neun Monaten, die nichtregulierte Energieentwertung ( $\Phi_{NO}$ ) in Kollmar deutlich an (Abbildung 24). Die hohen  $\Phi_{NO}$ -Werte weisen auf starken Stress hin, da die Pflanzen nicht mehr in der Lage sind, die überschüssige Energie über protektive Mechanismen zu entwerten (Kramer et al., 2004). Zusätzlich ist der Anteil "offener" PS II-Reaktionszentren (qL) bei D. cespitosa in Kollmar reduziert (Abbildung 25), was ebenfalls ein Anzeichen für Stress und unzureichende photoprotektive Mechanismen ist (Kramer et al., 2004). Wenn die photoprotektiven Mechanismen nicht mehr ausreichen. kommt es zu einer Überreduktion der Elektronentransporter und anschließenden Zellschädigungen, in erster Linie durch ROS (Eberhard et al., 2008).

Die niedrigeren  $\Phi_{PSII}$ -Werte zeigen außerdem, dass ein geringerer Anteil der absorbierten Energie photochemisch genutzt wird. Zusätzlich konnte Ambroselli (2013) sechs Wochen nach der reziproken Verpflanzung nachweisen, dass die RuBisCO-Aktivase in *D. cespitosa*-Blättern am Standort Kollmar im Vergleich zum Krempermoor herunterreguliert war. Durch die Aktivierung der RuBisCO spielt die RuBisCO-Aktivase eine wichtige Rolle bei der Regulation der CO<sub>2</sub>-Fixierung (Portis, 1992). Die herunterregulierte RuBisCO-Aktivase deutet somit auf eine herabgesenkte Kapazität zur CO<sub>2</sub>-Fixierung hin. Dies könnte zusammen mit der geringeren photosynthetischen Effizienz zu einer geringeren Assimilationsrate führen

122

und damit langfristig zu einer Erschöpfung der Kohlenhydratspeicher, insbesondere bei erhöhten Fermentationsraten durch zusätzlichen Kohlenstoffverlust in Form von Ethanol (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Colmer & Voesenek, 2009).

### 4.2.5. Schlussfolgerungen

In einem reziproken Verpflanzungsexperiment im Freiland konnte nachgewiesen werden, dass sowohl *Deschampsia cespitosa* als auch *D. wibeliana* im Habitat des Schwestertaxons überleben, zumindest über einen Zeitraum von neun Monaten. Der optische Eindruck und die Ergebnisse der Deckung oberirdischer Biomasse nach neun Monaten deuten jedoch auf eine geringere Biomasse des jeweils fremden Taxons an beiden Standorten hin, was mit den Ergebnissen zur Biomasseentwicklung in Reaktion auf periodische Überflutung von Heydel (2008) übereinstimmt.

Am tidebeeinflussten Standort Kollmar wurde außerdem die Bildung akklimatisierter "semi-aquatischer" Blätter mit einer erhöhten SLA bei *D. cespitosa* nachgewiesen. Diese höhere SLA kann nur nach sechs Wochen auf eine geringere Blattdicke zurückgeführt werden, nicht jedoch nach neun Monaten. Möglicherweise kommt die hohe SLA in den "semi-aquatischen" Blättern durch verringerte Konzentrationen von NSC zustande. Hinweise darauf liefern die Ergebnisse der Photosynthese-Regulation, die eine niedrigere photosynthetische Effizienz der *D. cespitosa*-Pflanzen in Kollmar nachweisen. Ambroselli (2013) konnte außerdem zeigen, dass in denselben Pflanzen die RuBisCO-Aktivase herunterreguliert wird. Das weist auf eine geringere Kohlenstofffixierungsrate hin und könnte langfristig zu einer Erschöpfung der Speicherkohlenhydrate führen.

Zusätzlich zeigt sich anhand der gemessenen Photosyntheseparameter an allen drei Messzeitpunkten eine starke Stressreaktion bei *D. cespitosa* in Kollmar, was darauf hindeutet, dass die Akklimatisierung der Blätter für eine Stressvermeidung im tidebeeinflussten Habitat nicht ausreicht. Bei *D. wibeliana* hingegen ist eine starke Stressreaktion im fremden Habitat (Krempermoor) nur nach sechs Wochen nachweisbar und kann mit einem starken Pilzbefall zu diesem Zeitpunkt erklärt werden, der signifikant stärker die Blätter von *D. wibeliana* betraf. Zusätzlich zeigt die Untersuchung der Photosynthese Hinweise auf Anpassungen an unterschiedliche Lichtintensitäten beider Taxa. Die Lichtsättigungseigenschaften deuten auf Anpassungen an höhere Lichtintensitäten bei *D. cespitosa* und niedrigere Lichtintensitäten bei *D. wibeliana* hin.

Die Untersuchung der ADH-Aktivität bestätigt die Ergebnisse des Laborversuchs insofern, als dass auch im Freiland beide Taxa deutlich erhöhte ADH-Aktivitäten in den Blättern periodisch überfluteter Pflanzen aufweisen. Interessanterweise gibt es bei *D. wibeliana* einen signifikanten linearen Zusammenhang zwischen der wöchentlichen Überflutungsdauer und der ADH-Aktivität in den Blättern. Im Gegensatz dazu deutet eine niedrigere ADH-Aktivität in den "semi-aquatischen" Blättern von *D. cespitosa* auf eine verbesserte O<sub>2</sub>-Versorgung in diesen Blättern hin.

# 4.3. Weiterführende Experimente zur Unterwasser-Photosynthese und dem Unterwasser-Gasaustausch

Um die möglicherweise verbesserte O2-Versorgung der akklimatisierten Blätter von D. cespitosa zu untersuchen, wurden weiterführende Experimente unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde zum einen die Unterwasser-Photosynthese betrachtet und zum anderen der Unterwasser-Gasaustausch. Eine erhöhte Unterwasser-Photosyntheserate führt zu einem erhöhten internen pO<sub>2</sub>, solange Licht und CO<sub>2</sub> ausreichend zur Verfügung stehen (Winkel et al., 2013). Im Dunkeln kann ein verstärkter Gasaustausch zwischen Blättern und Überflutungswasser die Sauerstoffversorgung im pflanzlichen Gewebe verbessern (Colmer & Pedersen, 2008b; Winkel et al., 2011; Pedersen & Colmer, 2012). Dazu kann unter anderem ein stomatärer Gasaustausch über Gasfilme auf der Blattoberfläche beitragen (Colmer & Pedersen, 2008b; Verboven et al., 2014). Außerdem ist eine effektive Gasdiffusion innerhalb der Pflanze wichtig, um den Sauerstoff aus den Blättern in die unterirdischen Pflanzenteile zu transportieren (Colmer & Voesenek, 2009). Nach Mommer et al. (2007) ist die Gewebeporosität positiv mit der pflanzeninternen Gasdiffusion korreliert.

Daher wurde in einem ersten Experiment neben der Unterwasser-Photosynthese und Dunkelatmung auch die Gasfilmdicke und Blattporosität nach drei Wochen periodischer Überflutung bestimmt. Zur Quantifizierung des Stresszustandes wurden außerdem Messungen zur Photosynthese-Effektivität durchgeführt, da bekannt ist, dass insbesondere das PS II sensitiv für eine Vielzahl von Stressoren ist (Baker, 2008; Ashraf & Harris, 2013; siehe dazu auch Abschnitt 4.2.4.). Zusätzlich wurde die SLA der untersuchten Blätter gemessen, um zu überprüfen, ob die im Freiland gefundene Erhöhung der SLA bei periodisch überfluteten *D. cespitosa*-Pflanzen auch unter kontrollierten Bedingungen nachgewiesen werden kann.

# 4.3.1. Auch im Laborversuch erhöht *D. cespitosa* die SLA in Reaktion auf periodische Überflutung

Tatsächlich konnte auch im Laborversuch eine Erhöhung der SLA in periodisch überfluteten *D. cespitosa*-Pflanzen nachgewiesen werden, während die SLA bei *D. wibeliana* in periodisch überfluteten Pflanzen und Kontrollpflanzen gleichauf liegt (Abbildung 48). Allerdings ist der Unterschied zwischen beiden Varianten bei *D. cespitosa* trotz eines Anstiegs der SLA um 25 % nicht signifikant. *D. cespitosa* weist jedoch insgesamt signifikant höhere SLA-Werte auf als *D. wibeliana*, da es einen signifikanten Taxon-Effekt gibt. Im Unterschied zum Verpflanzungsexperiment im Freiland konnte im Laborversuch kein Absterben der *D. cespitosa*-Blätter mit anschließender Neubildung akklimatisierter Blätter beobachtet werden. Somit weisen die bereits vorhandenen Blätter nach drei Wochen periodischer Überflutung eine erhöhte SLA auf, was erneut eher auf Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der Blätter (wie z. B. niedrigere NSC-Konzentrationen) hinweist als auf eine veränderte Morphologie (siehe dazu auch Abschnitt 4.2.2.).

Interessanterweise gibt es signifikante Unterschiede der Gasfilmdicke zwischen den Taxa. Sowohl bei periodisch überfluteten Pflanzen als auch bei den Kontrollpflanzen weist *D. wibeliana* signifikant dickere Gasfilme auf als *D. cespitosa* (Abbildung 49 A). Bei der Blattporosität liegen die Werte in beiden Varianten tendenziell bei *D. cespitosa* höher und es konnte ein signifikanter Taxon-Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 49 B). Beide Parameter können eine wichtige Rolle bei der Überflutungstoleranz von Arten spielen (Colmer & Voesenek, 2009). Gasfilme auf der Blattoberfläche verbessern den Unterwasser-Gasaustausch (Colmer & Pedersen, 2008b; Winkel et al., 2011; Verboven et al., 2014) und eine höhere Gewebeporosität ermöglicht eine verbesserte Gasdiffusion innerhalb der Pflanze (Mommer et al., 2007). Außerdem trägt eine höhere Blattporosität zu einer höheren SLA bei, indem die Trockenmasse pro Flächeneinheit durch einen höheren Anteil gasgefüllter Räume reduziert wird. Dies kann den Unterschied der SLA zwischen beiden Taxa erklären, nicht aber den Unterschied zwischen periodisch überfluteten Pflanzen und Kontrollpflanzen bei *D. cespitosa*, da die Blattporosität bei *D. cespitosa* in beiden Varianten gleich hoch ist (Abbildung 49 B).

# 4.3.2. Akklimatisierung an periodische Überflutung führt zu einer signifikant höheren Unterwasser-Photosynthese bei *D. cespitosa*

Die höchste Unterwasser-Nettophotosyntheserate wurde erstaunlicherweise bei den periodisch überfluteten *D. cespitosa*-Pflanzen gemessen (Abbildung 47 A). Dieser Wert ist signifikant höher als die Werte der periodisch überfluteten *D. wibeliana*-Pflanzen und der Kontrollpflanzen beider Taxa. Das zeigt, dass die akklimatisierten *D. cespitosa*-Blätter eine höhere O<sub>2</sub>-Produktion unter Wasser aufweisen, solange ausreichend Licht und CO<sub>2</sub> zur Verfügung stehen. Die Messung der Unterwasser-Photosynthese erfolgte in diesem Experiment bei einer CO<sub>2</sub>-Konzentration im Überflutungsmedium von 200 µmol L<sup>-1</sup>. Bei dieser CO<sub>2</sub>-Konzentration ist die Unterwasser-Photosynthese aufgrund des hohen Gasdiffusionswiderstands zwischen Überflutungswasser und Blatt durch die CO<sub>2</sub>-Aufnahme limitiert (Pedersen et al., 2009; Winkel et al., 2013). Somit weist die erhöhte Photosyntheserate in akklimatisierten Blättern von *D. cespitosa* auch auf einen verbesserten Unterwasser-Gasaustausch hin.

Außerdem konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass Unterschiede in der Toleranz gegenüber Überflutung nicht durch Unterwasser-Photosyntheseraten bei sättigender CO<sub>2</sub>-Konzentration erklärt werden können (Mommer et al., 2005a), sondern dass Unterschiede zwischen toleranten und nicht toleranten Arten bzw. zwischen akklimatisierten und nicht akklimatisierten Blättern bei niedrigen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen im Überflutungswasser bestehen (Mommer et al., 2004, 2005a, 2005b, 2006b). Daher ist nicht die maximale Unterwasser-Photosynthesekapazität für das Überleben überfluteter Pflanzen entscheidend, sondern die Photosyntheserate bei niedrigen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (Mommer et al., 2005a), wie sie auch bei Überflutungen im Freiland vorkommen (Winkel et al., 2013).

Bei *D. wibeliana* konnte kein Unterschied der Unterwasser-Photosyntheserate zwischen periodisch überfluteten Pflanzen und Kontrollpflanzen nachgewiesen werden (Abbildung 47 A). Die Werte liegen bei *D. wibeliana* aber insgesamt höher als bei den *D. cespitosa*-Kontrollpflanzen, wenn auch nicht signifikant. Jedoch gibt es eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Taxon und Behandlung, da bei den periodisch überfluteten Pflanzen bei *D. cespitosa* höher sind und die Werte der Kontrollpflanzen bei *D. wibeliana*. Somit weist *D. wibeliana* im Vergleich zu *D. cespitosa* generell eine erhöhte Unterwasser-Photosyntheserate bei nicht-sättigenden CO<sub>2</sub>-Konzentrationen auf (in dieser Studie 200 µmol CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>). *D. cespitosa* zeigt hingegen eine starke Akklimatisierungsreaktion an periodische

Überflutung mit einer signifikant erhöhten Unterwasser-Photosyntheserate in akklimatisierten Blättern.

Interessanterweise können die Unterschiede der Unterwasser-Photosyntheserate aber nicht mit den unterschiedlichen Gasfilmdicken zwischen den Taxa erklärt werden. *D. cespitosa* weist in beiden Varianten signifikant dünnere Gasfilme auf (Abbildung 49 A), hat aber gleichzeitig bei den periodisch überfluteten Pflanzen eine signifikant höhere Unterwasser-Photosyntheserate als *D. wibeliana* (Abbildung 47 A). Zwischen periodisch überfluteten Pflanzen und Kontrollpflanzen von *D. cespitosa* besteht kein Unterschied in der Gasfilmdicke, dennoch weisen die periodisch überfluteten Pflanzen eine signifikant höhere Unterwasser-Photosyntheserate auf. Auch Winkel et al. (2014) konnten in Reis zeigen, dass eine Abnahme der Gasfilmdicke keinen Einfluss auf die Unterwasser-Photosyntheserate hat. Die Unterwasser-Photosynthese wurde erst deutlich reduziert, als keine Gasfilme auf der Blattoberfläche mehr vorhanden waren. Das zeigt, dass nicht die Dicke des Gasfilms entscheidend für den Unterwasser-Gasaustausch ist, sondern vielmehr die Anwesenheit oder Abwesenheit eines Gasfilms.

Die Unterwasser-Dunkelatmung weist keine signifikanten Unterschiede zwischen den Taxa oder zwischen periodisch überfluteten Pflanzen und Kontrollpflanzen auf (Abbildung 47 B). Es gibt somit keine signifikanten Unterschiede im Unterwasser-Sauerstoffverbrauch beider Taxa in den Blättern.

Die in Abschnitt 1.7. gestellte Fragestellung 9) "Weist *D. wibeliana* eine höhere Unterwasser-Photosynthese bei nichtsättigender CO<sub>2</sub>-Konzentration auf?" kann somit beantwortet werden. Es wurde keine höhere Unterwasser-Photosyntheserate bei *D. wibeliana* im Vergleich zu *D. cespitosa* nachgewiesen, sondern an periodische Überflutung akklimatisierte *D. cespitosa*-Pflanzen wiesen signifikant höhere Photosyntheseraten unter Wasser auf (Abbildung 47).

# 4.3.3. Die Photosynthese-Effektivität weist auf leicht höheren Stress bei den Kontrollpflanzen hin

Auswirkungen einzelner Überflutungsereignisse auf den Stresszustand der periodisch überfluteten Pflanzen beider Taxa wurden durch Messungen des  $F_v/F_m$ -Werts und Quenching-Analysen im Verlauf von Licht-Induktionskurven (siehe dazu auch Abschnitt 4.2.4.) an zwei Zeitpunkten untersucht. Es wurde zum einen morgens, direkt vor einer Überflutungsphase, und zum anderen abends, direkt nach einer fünfstündigen Überflutung, gemessen. Die

Kontrollpflanzen waren in diesem Zeitraum nicht überflutet. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten nachgewiesen werden, was erneut darauf hindeutet, dass nicht ein einzelnes fünfstündiges Überflutungsereignis für eine Akklimatisierungsreaktion entscheidend ist, sondern die Abfolge regelmäßig wiederkehrender Überflutungsereignisse (siehe dazu auch Abschnitt 4.1.1.).

Zum Vergleich beider Taxa und der periodisch überfluteten Pflanzen mit den Kontrollpflanzen werden deshalb nur die Ergebnisse des ersten Zeitpunkts (morgens) herangezogen. Hier zeigt sich ein signifikant niedrigerer F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> bei den Kontrollpflanzen von D. cespitosa im Vergleich zu den drei anderen Varianten (Abbildung 41). Das weist auf eine Photoinhibition bei diesen Pflanzen hin (Björkman & Demmig, 1987). Jedoch sind die absoluten Unterschiede nur gering. Außerdem zeigt die Quenching-Analyse, dass die Photosynthese bei den periodisch überfluteten Pflanzen beider Taxa effektiver abläuft als bei den Kontrollpflanzen. Es gibt signifikante Effekte der Behandlung sowohl bei der Quantenausbeute des PS II (höhere  $\Phi_{PSII}$ -Werte bei den periodisch überfluteten Pflanzen; Abbildung 42) als auch beim regulierten nichtphotochemischen Quenching am Ende der Induktionskurve (niedrigere  $\Phi_{\text{NPO} end}$ -Werte bei den periodisch überfluteten Pflanzen; Abbildung 43) und beim nicht regulierten nichtphotochemischen Quenching (niedrigere  $\Phi_{NO}$ -Werte bei den periodisch überfluteten Pflanzen; Abbildung 44). Das zeigt, dass die periodisch überfluteten Pflanzen einen größeren Anteil der absorbierten Energie für photochemische Prozesse nutzen (höherer  $\Phi_{PSII}$ ) und geringere Anteile über Wärme (niedrigerer  $\Phi_{NPO}$ ) und andere Dissipationsprozesse (niedrigerer  $\Phi_{NO}$ ) entwerten (Kramer et al., 2004). Insbesondere die höheren  $\Phi_{NO}$ -Werte bei den Kontrollpflanzen weisen auf eine starke Stressreaktion hin, da die Pflanzen die überschüssige absorbierte Energie nicht mehr über regulierte Dissipationsprozesse entwerten können (Kramer et al., 2004).

Interessant ist außerdem, dass die periodisch überfluteten Pflanzen beider Taxa eine bessere Regulationsfähigkeit des nichtphotochemischen Quenchings haben. Der maximale  $\Phi_{NPQ}$ , der in der Induktionskurve kurz nach dem Einschalten des aktinischen Lichts erreicht wird, liegt bei den periodisch überfluteten Pflanzen beider Taxa höher als bei den Kontrollpflanzen, mit einem signifikanten Behandlungseffekt ( $\Phi_{NPQ max}$  in Abbildung 43). Im Verlauf der Induktionskurve wird die Wärmedissipation aber deutlich herunterreguliert, sodass die Werte am Ende der Kurve niedriger liegen als bei den Kontrollpflanzen (erneut mit einem signifikanten Behandlungseffekt;  $\Phi_{NPQ end}$  in Abbildung 43). Das gleiche Muster zeigt

128

sich auch bei dem NPQ-Wert, der ebenfalls ein Maß für das nichtphotochemische Quenching darstellt (Abbildung 46).

Zusätzlich zeigen sich aber auch signifikante Unterschiede zwischen den Taxa, mit einer insgesamt höheren Photosynthese-Effektivität bei *D. wibeliana*. *D. wibeliana* weist sowohl bei den periodisch überfluteten Pflanzen als auch bei den Kontrollpflanzen höhere  $\Phi_{PSII}$ -Werte und niedrigere  $\Phi_{NPQ}$ -Werte am Ende der Kurve auf und es konnte für beide Parameter ein signifikanter Taxon-Effekt nachgewiesen werden (Abbildung 42 und  $\Phi_{NPQ}$  end in Abbildung 43). Außerdem weisen die periodisch überfluteten Pflanzen von *D. wibeliana* einen tendenziell höheren Anteil "offener" PS II Reaktionszentren auf (höherer qL in Abbildung 45), was ebenfalls auf ein niedrigeres Stresslevel hindeutet (Kramer et al., 2004).

Es zeigt sich somit, dass die Kontrollpflanzen stärker gestresst sind als die periodisch überfluteten Pflanzen. Eine mögliche Erklärung könnte die Nährstoffversorgung liefern. Alle Pflanzen wurden vor Beginn des Experiments in der hydroponischen Kultur mit neuem Nährmedium versorgt (siehe auch Abschnitt 2.2.3.1. im Kapitel Material und Methoden). Im Verlauf des Experiments wurde die Nährlösung alle zwei Tage mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Bei den periodisch überfluteten Pflanzen kam es jedoch auch zu einem Eindringen des Überflutungsmediums (nach Smart & Barko, 1985; siehe Tabelle 1 im Abschnitt 2.2.3.1.) in die Nährlösung, was wahrscheinlich zu einem zusätzlichen Eintrag geringer Kalium-, Magnesium- und Calciummengen geführt hat. Wenn eines dieser Elemente im Verlauf des dreiwöchigen Experiments bei den Kontrollpflanzen im Minimum vorlag, könnte dieser zusätzliche Eintrag über das Überflutungswasser die höhere photosynthetische Effizienz der periodisch überfluteten Pflanzen erklären. Aus diesem Grund wurde bei dem späteren Experiment zum Unterwasser-Gasaustausch die Nährlösung sowohl bei den periodisch überfluteten Pflanzen als auch bei den Kontrollpflanzen alle zwei Tage mit dem Überflutungsmedium nach Smart & Barko (1985) aufgefüllt.

Um die in Abschnitt 1.7. gestellte Fragestellung 3) "Ist *D. wibeliana* durch periodische Überflutung weniger gestresst als *D. cespitosa*?" zu beantworten, müssen sowohl die Ergebnisse aus dem Freiland als auch die Laborergebnisse betrachtet werden. Signifikant höhere  $F_v/F_m$ -Werte im Labor und im Freiland weisen auf ein geringeres Stresslevel bei periodisch überfluteten *D. wibeliana*-Pflanzen im Vergleich zu *D. cespitosa* hin, auch wenn die absoluten Unterschiede relativ gering sind (Abbildung 20 und 41).

# 4.3.4. Verbesserte interne O<sub>2</sub>-Versorgung im Dunkeln durch Akklimatisierung an periodische Überflutung

Um sowohl generelle Unterschiede zwischen den Taxa als auch Unterschiede zwischen akklimatisierten und nicht akklimatisierten Blättern bezüglich des Unterwasser-Gasaustauschs zu untersuchen, wurde der pflanzeninterne pO<sub>2</sub> im Verlauf einer Überflutungsphase in zuvor periodisch überfluteten und zuvor nicht überfluteten Pflanzen gemessen. Die Messungen erfolgten im Wurzelaerenchym, da sich Messungen in den Blättern als schwierig umsetzbar erwiesen und bekannt ist, dass sich der Wurzel-pO<sub>2</sub> ebenfalls in Reaktion auf Veränderungen im Sprossbereich schnell verändert, sofern ein ausreichender interner Gastransport gewährleistet ist (Colmer & Pedersen, 2008a; Pedersen et al., 2009; Herzog & Pedersen, 2014; siehe dazu auch Abschnitt 3.3.2. im Kapitel Ergebnisse).

Ein diffusiver Gastransport aus den Blättern in den Wurzelbereich sollte möglich sein, da beide Taxa große Aerenchymanteile in den Wurzeln aufweisen (Abbildung 50). Die schnelle pflanzeninterne Gasdiffusion zeigt sich auch an den schnellen Veränderungen des pO<sub>2</sub> im Wurzelaerenchym in Reaktion auf veränderte Bedingungen im oberirdischen Bereich (Abbildung 51). Außerdem weisen beide Taxa bei nicht überflutetem Spross in den Wurzeln Sauerstoffpartialdrücke zwischen 33 und 62 % air sat. auf (Abbildung 52 und 53 A), obwohl sich diese in anoxischem Medium befinden (siehe Abschnitt 2.3.4.2. im Kapitel Material und Methoden). Sobald der Spross vollständig überflutet wird, sinkt der pO<sub>2</sub> bei allen Varianten auf deutlich niedrigere hypoxische Level ab. Eine Bestrahlung des überfluteten Sprosses führt aber schnell wieder zu einem deutlichen Anstieg des pO<sub>2</sub> im Wurzelaerenchym auf 32-40 % air sat. (Abbildung 52). Das zeigt die Wichtigkeit der O<sub>2</sub>-Aufnahme und -Produktion in den Blättern, auch für die Sauerstoffversorgung der Wurzeln, und steht im Einklang mit früheren Studien in Reis, in denen ebenfalls gezeigt werden konnte, dass sowohl die Anwesenheit von Gasfilmen als auch Unterwasser-Photosynthese die Sauerstoffversorgung der Wurzeln deutlich verbessern (Pedersen et al., 2009; Winkel et al., 2013).

Bei den Messungen nach sechs Wochen konnten keine Unterschiede zwischen beiden Taxa und zwischen den akklimatisierten und nicht akklimatisierten Pflanzen nachgewiesen werden (Abbildung 52). Es wurde vermutet, dass O<sub>2</sub>-Diffusion aus der Luft in die anoxische Lösung in der Wurzelkammer insbesondere die Ergebnisse bei überflutetem Spross im Dunkeln beeinflusst haben könnte, da hier bereits ein geringer Sauerstoffeintrag von außen einen starken Effekt auf den wurzelinternen pO<sub>2</sub> haben könnte. Daher wurden nach acht Wochen erneut Messungen durchgeführt, bei denen die Wurzelkammer zusätzlich mit

## Diskussion

Glasplatten abgedeckt wurde, um eine O<sub>2</sub>-Diffusion aus der Luft in das Medium zu unterbinden. Bei diesen Messungen wurde erneut ein starkes Absinken des pO<sub>2</sub> im Wurzelaerenchym nach vollständiger Überflutung des Sprosses nachgewiesen (Abbildung 53). Zusätzlich wurde hier jedoch gezeigt, dass der pO<sub>2</sub> bei den nicht akklimatisierten Kontrollpflanzen beider Taxa deutlich stärker absinkt als bei den zuvor periodisch überfluteten Pflanzen (Abbildung 53 B), was zusätzlich durch einen signifikanten Behandlungseffekt belegt wird. Hier zeigt sich also eine signifikante Verbesserung des Unterwasser-Gasaustauschs durch Akklimatisierung an periodische Überflutung bei beiden Taxa.

Da insgesamt eine hohe Variabilität innerhalb der pO<sub>2</sub>-Daten vorlag, wurde versucht einen Teil der Variabilität über das Verhältnis der oberirdischen zur unterirdischen Biomasse zu erklären. Ein höherer Anteil oberirdischer Biomasse könnte zu einer stärkeren Gasaustauschund Photosynthesekapazität führen und damit zu höheren internen pO<sub>2</sub>-Werten, während ein höherer Anteil der Wurzelbiomasse durch einen höheren Anteil respiratorischen Gewebes, das in diesem Versuchsaufbau keinen Sauerstoff aufnehmen und produzieren kann, zu niedrigeren pO<sub>2</sub>-Werten führen könnte. Die hohe Variabilität innerhalb der pO<sub>2</sub>-Daten kann allerdings nicht mit dem Verhältnis aus oberirdischer zu unterirdischer Biomasse erklärt werden. Allerdings zeigt sich eine leichte Tendenz zu einer verstärkten Biomasse-Allokation in die oberirdischen Pflanzenteile bei den periodisch überfluteten Pflanzen beider Taxa (Abbildung 54). Das steht im Einklang mit dem Konzept des "funktionalen Equilibriums", das besagt, dass Pflanzen größere Biomasseanteile in den Bereich umverteilen, in dem der limitierende Faktor für das Pflanzenwachstum wirkt (Poorter et al., 2012), was durch die periodische Überflutung in diesem Fall der oberirdische Pflanzenteil ist.

Fragestellung 8) "Führt eine Akklimatisierung an periodische Überflutung in einem der Taxa zu einem erhöhten pflanzeninternen Sauerstoffpartialdruck unter Wasser?" (siehe Abschnitt 1.7.) kann somit für beide Taxa positiv beantwortet werden. Bei beiden Taxa wurde im überfluteten Zustand im Dunkeln ein signifikant höherer Wurzel-pO<sub>2</sub> in den periodisch überfluteten Pflanzen im Vergleich zu nicht akklimatisierten Kontrollpflanzen nachgewiesen (Abbildung 53).

### 4.4. Fazit

Die zwei grundlegenden Hypothesen dieser Untersuchungen lauten: I) *D. wibeliana* weist Toleranzmechanismen gegenüber periodischer Überflutung auf. II) *D. cespitosa* fehlen diese Toleranzmechanismen. Tatsächlich wurden zwischen den Taxa Unterschiede in der Reaktion auf Überflutung nachgewiesen. Jedoch weisen die Ergebnisse sowohl bei *D. wibeliana* als auch bei *D. cespitosa* auf spezifische Anpassungsmechanismen gegenüber Überflutung hin.

Für *D. wibeliana* wurde keine Akklimatisierungsreaktion der untersuchten Blattmerkmale nachgewiesen. Jedoch weisen die *D. wibeliana*-Blätter generell eine hohe Gasfilmdicke auf und verfügen zumindest im Laborversuch über eine effektivere Photosynthese mit höheren  $\Phi_{PSII}$ -Werten (Tabelle 3). Zusätzlich wurde für *D. wibeliana*-Blätter im Vergleich zu akklimatisierten *D. cespitosa*-Blättern eine höhere ADH-Aktivität nachgewiesen (Abbildung 16), die außerdem in einem positiven linearen Zusammenhang mit der Überflutungsdauer steht (Abbildung 17 B). Das weist auf eine echte Stresstoleranz gegenüber Überflutungsstress hin und deutet somit auf eine "Quiescence"-Strategie in Reaktion auf Überflutung bei *D. wibeliana* hin (vgl. Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Diese Strategie wird in der Literatur als vorteilhafte Anpassung an kurzzeitige Überflutungen beschrieben (Bailey-Serres & Voesenek, 2008; Colmer & Voesenek, 2009) und erweist sich somit im natürlichen *D. wibeliana*-Habitat mit zwei täglichen Kurzzeitüberflutungen als Vorteil. Somit können beide Hypothesen angenommen werden. *D. wibeliana* weist Toleranzmechanismen gegenüber periodischer Überflutung auf, die *D. cespitosa*, zumindest in diesem Ausmaß, fehlen. Jedoch wurden bei *D. cespitosa* Hinweise auf andere Anpassungen an Überflutung gefunden.

So zeigt *D. cespitosa* in Reaktion auf periodische Überflutung im Freiland eine schnelle Akklimatisierungsreaktion der Blätter mit einer Bildung neuer "semi-aquatischer" Blätter innerhalb von sechs Wochen (Abbildung 14). Diese neuentwickelten Blätter weisen im Vergleich zu *D. wibeliana* eine höhere SLA und eine niedrigere ADH-Aktivität auf. Außerdem wurde in akklimatisierten *D. cespitosa*-Blättern im Labor eine signifikant erhöhte Unterwasser-Photosyntheserate nachgewiesen (Tabelle 3). Diese Merkmale weisen auf eine Stressvermeidungsstrategie hin, die jedoch nicht wie die LOES-Strategie auf einer Wiederherstellung des Luftkontakts durch verstärktes Längenwachstum beruht, sondern auf einer Akklimatisierung der Blätter (vgl. Bailey-Serres & Voesenek, 2008). Diese Akklimatisierung führt zu einem verbesserten Unterwasser-Gasaustausch und damit zu einer erhöhten internen O<sub>2</sub>-Konzentration (Mommer et al., 2004, 2007). Eine solche Strategie wird in der Literatur als Anpassung an langfristige und tiefe Überflutungen beschrieben (Colmer &

132

Voesenek, 2009). Banach et al. (2009) wiesen für *D. cespitosa* eine Überflutungstoleranz gegenüber sechswöchiger vollständiger Überflutung nach. Somit scheint *D. cespitosa* eher an langfristige Überflutungen angepasst zu sein. Bei kurzfristigen Überflutungen könnte diese Strategie aufgrund des hohen energetischen Aufwands von Nachteil sein und zu der geringeren Deckung der *D. cespitosa*-Pflanzen nach neun Monaten am tidebeeinflussten Standort Kollmar führen (Abbildung 40). Ein Beispiel für die evolutive Entwicklung unterschiedlicher Strategien in Reaktion auf Überflutung ist die Evolution des *Sub1* Locus in Reis, bei dem bereits die Veränderung eines Gens zu einer Änderung der Strategie von LOES zu "Quiescence" führt (Jackson et al., 2009). Also könnte auch bei *D. wibeliana* eine Adaptation vorliegen, die eine Veränderung der Strategie bedingt und eine Ausbreitung in den Tidemarschen der Elbe ermöglicht.

In der vorliegenden Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Kombination aus Labor- und Freilandexperimenten bei ökophysiologischen Fragestellungen sinnvoll ist. Laborexperimente ermöglichen Versuche unter kontrollierten Bedingungen, um so physiologische Reaktionen auf einen einzelnen Stressor zu untersuchen. Jedoch zeigen sich einige Anpassungsreaktionen der Pflanzen erst im Freiland unter dem Einfluss multipler abiotischer und biotischer Faktoren. Zur Beantwortung der Fragestellung 7) "Gibt es qualitative oder quantitative Unterschiede in der Reaktion auf periodische Überflutung zwischen Labor- und Freilandexperimenten?" aus Abschnitt 1.7. kann die Übersicht der Ergebnisse in Tabelle 3 herangezogen werden. Es wurden sowohl quantitative Unterschiede nachgewiesen mit eher stärkeren Reaktionen im Freiland (höhere ADH-Aktivität, stärkere Erhöhung der SLA bei *D. cespitosa*) als auch qualitative. Bei nicht überfluteten Pflanzen wurden im Labor höhere  $F_v/F_m$ -Werte bei *D. wibeliana* nachgewiesen und im Freiland bei *D. cespitosa*. Eine Kombination aus Labor- und Freilandexperimenten ist somit sinnvoll für die Untersuchung von Stressreaktionen.

## 4.5. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern deutliche Hinweise auf unterschiedliche Strategien der beiden untersuchten Taxa in Reaktion auf Überflutung. Um diese Hinweise zu verstärken, sind weitere vergleichende Untersuchungen zwischen *D. wibeliana* und *D. cespitosa* denkbar. Dabei können weitere Parameter untersucht werden, die in der Literatur als wichtige Merkmale der jeweiligen Anpassungsstrategien beschrieben werden.

## Diskussion

Im Hinblick auf eine mögliche Stressvermeidungsstrategie bei D. cespitosa sind Untersuchungen der Cuticuladicke und -zusammensetzung im Vergleich zwischen akklimatisierten "semi-aquatischen" und nicht akklimatisierten Blättern von großem Interesse, Gasdiffusionswiderstand zwischen da die Cuticula den größten Blättern und Überflutungswasser darstellt (Frost-Christensen et al., 2003). Außerdem ist eine Messung der NSC-Konzentrationen im Verlauf von periodischer Überflutung in beiden Taxa interessant. Dadurch wäre es möglich, eine Aussage darüber zu treffen, ob die erhöhte SLA in akklimatisierten D. cespitosa-Blättern auf geringere NSC-Konzentrationen zurückzuführen ist und ob D. wibeliana in der Lage ist, unter dem Einfluss periodischer Überflutung größere Kohlenstoffmengen zu speichern. Eine stärkere Assimilatspeicherung ist ebenfalls eine Anpassung im Sinne einer Toleranz- oder "Quiescence"-Strategie.

Zusätzlich zu den ADH-Messungen in den Blättern sind außerdem Untersuchungen zur Regulation der ADH in den Wurzeln interessant. Insbesondere der Vergleich der ADH-Aktivitäten in Wurzeln und Spross kann Aufschluss über den Grad der Überflutungstoleranz geben (Kennedy et al., 1992). Weiterhin können über Untersuchungen der Reaktion beider Taxa auf erhöhte Ethylen-Konzentrationen Rückschlüsse auf die Anpassungsstrategie gezogen werden, da bei Reis nachgewiesen wurde, dass Ethylen in Abhängigkeit vom vorhandenen Allel des *Sub1A*-Gens entweder die LOES- oder die "Quiescence"-Strategie induziert (Bailey-Serres & Voesenek, 2008).

Um einen Überblick über Anpassungsstrategien an unterschiedliche Überflutungsregime innerhalb des *D. cespitosa*-Komplexes zu erhalten, ist es außerdem sinnvoll, weitere Taxa in die Untersuchungen mit einzubeziehen. So sind insbesondere *D. bottnica*, das endemisch an der Ostseeküste ist (Scholz, 2007), und *D. littoralis*, das ausschließlich an Fluss- und Seeufern in der Schweiz vorkommt (Chiapella, 2000), interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen zur Überflutungstoleranz. Auf diese Weise könnte ein weiterer Beitrag zur Aufklärung der Anpassungsmechanismen an spezifische Überflutungsregime und zur evolutionsgeschichtlich noch jungen Differenzierung unterschiedlicher Taxa innerhalb des *D. cespitosa*-Komplexes geleistet werden.

134

# Literatur

- Adam N.K. (1963) Principles of Water Repellency. In *Waterproofing and Water Repellency* (Hrsg. J.L. Molliet), pp. 1–23. Elsevier, Amsterdam.
- Albrecht G. & Wiedenroth E.M. (1994) Protection against activated oxygen following re-aeration of hypoxically pretreated wheat roots. The response of the glutathione system. *Journal of Experimental Botany* 45, 449–455.
- Ambroselli V. (2013) Proteomische und molekulare Untersuchungen zur ökophysiologischen Differenzierung von *Deschampsia wibeliana* (Sond.) Parl. und *Deschampsia cespitosa* (L.) P. Beauv. s. str. Dissertation, Universität Hamburg.
- Andrews D.L., Cobb B.G., Johnson J.R. & Drew M.C. (1993) Hypoxic and Anoxic Induction of Alcohol Dehydrogenase in Roots and Shoots of Seedlings of *Zea mays*. *Plant Physiology* 101, 407–414.
- Andrews D.L., Drew M.C., Johnson J.R. & Cobb B.G. (1994) The Response of Maize Seedlings of Different Ages to Hypoxic and Anoxic Stress. *Plant Physiology* 105, 53–60.
- Apel K. & Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373–399.
- Armstrong J., Keep R. & Armstrong W. (2009) Effects of oil on internal gas transport, radial oxygen loss, gas films and bud growth in *Phragmites australis*. *Annals of Botany* 103, 333–340.
- Arnell, N. & Liu, C. (2001) Climatic Change 2001: hydrology and water resources. Report from the Intergovernmental Panel on Climate Change. Zugriff am 12.06.2014 unter http://www.grida.no/ publications/other/ipcc\_tar/.
- Ashraf M. & Harris, P.J.C. (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51, 163–190.
- Bailey-Serres J. & Freeling M. (1990) Hypoxic Stress-Induced Changes in Ribosomes of Maize Seedling Roots. *Plant Physiology* 94, 1237–1243.
- Bailey-Serres J. & Voesenek L. (2008) Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. Annual Review of Plant Biology 59, 313–339.
- Bailey-Serres J., Fukao T., Gibbs D.J., Holdsworth M.J., Lee S.C., Licausi F., Perata P., Voesenek L.A. & van Dongen J.T. (2012) Making sense of low oxygen sensing. *Trends in Plant Science* 17, 129–138.
- Baker N.R. (2008) Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59, 89–113.
- Banach K., Banach A.M., Lamers L.P.M., Kroon H. de, Bennicelli R.P., Smits A.J.M. & Visser E.J.W. (2009) Differences in flooding tolerance between species from two wetland habitats with contrasting hydrology: implications for vegetation development in future floodwater retention areas. *Annals of Botany* 103, 341– 351.
- Benz B.R., Rhode J.M. & Cruzan M.B. (2007) Aerenchyma Development and Elevated Alcohol Dehydrogenase Activity as Alternative Responses to Hypoxic Soils in the *Piriqueta Caroliniana* Complex. *American Journal of Botany* 94, 542–550.
- Biemelt S. (1998) Re-Aeration following Hypoxia or Anoxia Leads to Activation of the Antioxidative Defense System in Roots of Wheat Seedlings. *Plant Physiology* 116, 651–658.
- Bilger W. & Björkman O. (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research* 25, 173–185.
- Björkman O. (1981) Responses to Different Quantum Flux Densities. In *Physiological Plant Ecology I* (Hrsg. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond & H. Ziegler), pp. 57–107. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Björkman O. & Demmig B. (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170, 489–504.

- Blokhina O., Virolainen E. & Fagerstedt K.V. (2003) Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* 91, 179–194.
- Blom C., Voesenek L., Banga M., Engelaar M., Rijnders J.H.G.M., van de Steeg, H.M. & Visser, E.J.W. (1994) Physiological Ecology of Riverside Species: Adaptive Responses of Plants to Submergence. *Annals of Botany* 74, 253–263.
- Blom C. & Voesenek L. (1996) Flooding: the survival strategies of plants. *Trends in Ecology & Evolution* 11, 290–295.
- Boardman N.K. (1977) Comparative Photosynthesis of Sun and Shade Plants. *Annual Review of Plant Physiology* 28, 355–377.
- Boeger, M.R.T. & Poulson M.E. (2003) Morphological adaptations and photosynthetic rates of amphibious *Veronica anagallis-aquatica* L. (Scrophulariaceae) under different flow regimes. *Aquatic Botany* 75, 123–135.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 76, 248–254.
- Branco-Price C., Kaiser K.A., Jang C.J.H., Larive C.K. & Bailey-Serres J. (2008) Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 56, 743–755.
- Brewer C.A., Smith W.K. & Vogelmann T.C. (1991) Functional interaction between leaf trichomes, leaf wettability and the optical properties of water droplets. *Plant, Cell and Environment* 14, 955–962.
- Bruxelles G. de, Peacock W.J., Dennis E.S. & Dolferus R. (1996) Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 111, 381–391.
- Burdick D.M. & Mendelssohn I.A. (1990) Relationship Between Anatomical and Metabolic Responses to Soil Waterlogging in the Coastal Grass *Spartina patens*. *Journal of Experimental Botany* 41, 223–228.
- Chiapella J.O., DeBoer V.L., Amico G.C. & Kuhl J.C. (2011) A morphological and molecular study in the Deschampsia cespitosa complex (Poaceae; Poeae; Airinae) in northern North America. American Journal of Botany 98, 1366–1380.
- Chiapella J. (2000) The *Deschampsia cespitosa* complex in central and northern Europe: a morphological analysis. *Botanical Journal of the Linnean Society* 134, 495–512.
- Chiapella J. & Probatova N.S. (2003) The *Deschampsia cespitosa* complex (Poaceae: Aveneae) with special reference to Russia. *Botanical Journal of the Linnean Society* 142, 213–228.
- Cobb B.G. & Kennedy R.A. (1987) Distribution of alcohol dehydrogenase in roots and shoots of rice (*Oryza sativa*) and *Echinochloa* seedlings. *Plant, Cell and Environment* 10, 633–638.
- Colmer T.D., Armstrong W., Greenway H., Ismail A.M., Kirk G.J.D. & Atwell B.J. (2014) Physiological Mechanisms of Flooding Tolerance in Rice: Transient Complete Submergence and Prolonged Standing Water. In *Progress in Botany* (Hrsg. U. Lüttge, W. Beyschlag & J. Cushman), pp. 255–307. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Colmer T.D. & Pedersen O. (2008a) Oxygen dynamics in submerged rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist* 178, 326–334.
- Colmer T.D. & Pedersen O. (2008b) Underwater photosynthesis and respiration in leaves of submerged wetland plants: gas films improve CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> exchange. *New Phytologist* 177, 918–926.
- Colmer T.D. & Voesenek L.A.C.J. (2009) Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. *Functional Plant Biology* 36, 665.
- Colmer T.D., Winkel A. & Pedersen O. (2011) A perspective on underwater photosynthesis in submerged terrestrial wetland plants. *AoB Plants*. Zugriff am 28.12.2011 unter http://aobpla.oxfordjournals.org/content/2011/ plr030.full.
- Cooke F.P., Brown J.P. & Mole S. (1984) Herbivory, Foliar Enzyme Inhibitors, Nitrogen and Leaf Structure of Young and Mature Leaves in a Tropical Forest. *Biotropica* 16, 257.
- Crawford R.M. (1966) Alcohol deyhdrogenase activity in relation to flooding tolerance in roots. *Journal of Experimental Botany* 18, 458–464.
- Crisp D.J. (1963) Waterproofing Mechanisms in Animals and Plants. In *Waterproofing and Water Repellency* (Hrsg. J.L. Molliet), pp. 416–481. Elsevier, Amsterdam.
- Das K.K., Panda D., Sarkar R.K., Reddy J.N. & Ismail A.M. (2009) Submergence tolerance in relation to variable floodwater conditions in rice. *Environmental and Experimental Botany* 66, 425–434.
- Dolferus R., Bruxelles G. de, Dennis E.S. & Peacock W.J. (1994) Regulation of the *Arabidopsis* Adh Gene by Anaerobic and Other Environmental Stresses. *Annals of Botany* 74, 301–308.
- Drew M.C. (1997) Oxygen Deficiency and Root Metabolism: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48, 223–250.
- Dytham C. (2011) Choosing and using statistics. A biologist's guide. Wiley-Blackwell, Hoboken.
- Eberhard S., Finazzi G. & Wollman F.A. (2008) The Dynamics of Photosynthesis. *Annual Review of Genetics* 42, 463–515.
- Fennoy S.L., Nong T. & Bailey-Serres J. (1998) Transcriptional and post-transcriptional processes regulate gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *The Plant Journal* 15, 727–735.
- Force L., Critchley C. & van Rensen J.J.S. (2003) New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynthesis Research* 78, 17–33.
- Frost-Christensen H., Jorgensen L.B. & Floto F. (2003) Species specificity of resistance to oxygen diffusion in thin cuticular membranes from amphibious plants. *Plant, Cell and Environment* 26, 561–569.
- Frost-Christensen H. & Sand-Jensen K. (1995) Comparative kinetics of photosynthesis in floating and submerged *Potamogeton* leaves. *Aquatic Botany* 51, 121–134.
- Fukao T. & Bailey-Serres J. (2004) Plant responses to hypoxia is survival a balancing act? *Trends in Plant Science* 9, 449–456.
- Fukao T., Xu K., Ronald P.C. & Bailey-Serres J. (2006) A variable cluster of ethylene response factor-like genes regulates metabolic and developmental acclimation responses to submergence in rice. *The Plant Cell* 18, 2021–2034.
- Garnczarska M. & Bednarski W. (2004) Effect of a short-term hypoxic treatment followed by re-aeration on free radicals level and antioxidative enzymes in lupine roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 233–240.
- Garnczarska M., Bednarski W. & Morkunas I. (2004) Re-aeration induced oxidative stress and antioxidative defenses in hypoxically pretreated lupine roots. *Journal of Plant Physiology* 161, 415–422.
- Geigenberger P. (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 247–256.
- Genty B., Briantais J.M. & Baker N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects* 990, 87–92.
- Gibbs J. & Greenway H. (2003) Review: Mechanisms of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology* 30, 1-47.
- Gleason M.L. & Zieman J.C. (1981) Influence of tidal inundation on internal oxygen supply of *Spartina* alterniflora and *Spartina patens*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 13, 47–57.
- Gundersen J.K. & Jørgensen B.B. (1990) Microstructure of diffusive boundary layers and the oxygen uptake of the sea floor. *Nature* 345, 604–607.
- Haldimann P. & Feller U. (2004) Inhibition of photosynthesis by high temperature in oak (*Quercus pubescens* L.) leaves grown under natural conditions closely correlates with a reversible heat-dependent reduction of the activation state of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant, Cell and Environment* 27, 1169–1183.
- Hanelt D. (1998) Capability of dynamic photoinhibition in arctic macroalgae is related to their depth distribution. *Marine Biology* 131, 361-369.

- Hänsch R., Mendel R.R., Cerff R. & Hehl R. (2003) Light-dependent Anaerobic Induction of the Maize Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase 4 (GapC4) Promoter in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *Annals of Botany* 91, 149–154.
- Hendrickson L., Furbank R.T. & Chow W.S. (2004) A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research* 82, 73–81.
- Herzog M. & Pedersen O. (2014) Partial versus complete submergence: snorkelling aids root aeration in *Rumex* palustris but not in *R. acetosa. Plant, Cell and Environment*. Zugriff am 06.03.2014 unter http://onlinelibrary. wiley.com/doi/10.1111/pce.12284/full
- Heydel F. (2008) Populationsbiologische Untersuchungen an *Deschampsia wibeliana* (Sond.) Parl. und *Deschampsia cespitosa* (L.) P. Beauv. s. str. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Hultén E. (1962) The circumpolar plants Vascular cryptogams, conifers, monocotyledons. *Kungl Svenska Vetenskaps Handl* 8, 1–275.
- Jackson M.B. (2008) Ethylene-promoted elongation: an adaptation to submergence stress. *Annals of Botany* 101, 229–248.
- Jackson M.B. & Drew M.C. (1984) Effects of flooding on growth and metabolism of herbaceous plants. In *Flooding and Plant Growth* (Hrsg. T.T. Kozlowski), pp. 47–128. Academic Press, Orlando, Fla.
- Jackson M.B., Ishizawa K. & Ito O. (2009) Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress. Annals of Botany 103, 137–142.
- Juntawong P., Sorenson R. & Bailey-Serres J. (2013) Cold shock protein 1 chaperones mRNAs during translation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 74, 1016–1028.
- Kato-Noguchi H. (1999) Flooding Induced Increase in Alcohol Dehydrogenase Activity in Timothy and Ryegrass Seedlings. *Biologia Plantarum* 42, 445-449.
- Keeley J.E. (1979) Population Differentiation along a Flood Frequency Gradient: Physiological Adaptations to Flooding in *Nyssa sylvatica*. *Ecological Monographs* 49, 89–108.
- Kennedy A.R., Rumpho M.E. & Fox T.C. (1987) Germination physiology of rice and rice weeds: metabolic adaptations to anoxia. In *Plant Life in Aquatic and Amphibious Habitats* (Hrsg. R. Crawford), pp. 193–203. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Kennedy A.R., Rumpho M.E. & Fox T.C. (1992) Anaerobic metabolism in plants. Plant Physiology 100, 1-6.
- Kramer D.M., Johnson G., Kiirats O. & Edwards G.E. (2004) New Fluorescence Parameters for the Determination of QA Redox State and Excitation Energy Fluxes. *Photosynthesis Research* 79, 209–218.
- Kürsteiner O., Dupuis I. & Kuhlemeier C. (2003) The pyruvate decarboxylase1 gene of Arabidopsis is required during anoxia but not other environmental stresses. *Plant Physiology* 132, 968–978.
- Laanbroek H.J. (1990) Bacterial cycling of minerals that affect plant growth in waterlogged soils: a review. *Aquatic Botany* 38, 109–125.
- Lambers H. & Poorter H. (1992) Inherent Variation in Growth Rate Between Higher Plants: A Search for Physiological Causes and Ecological Consequences. In *Advances in Ecological Research Volume 23* (Hrsg. M. Begon & A.H. Fitter), pp. 187–261. Elsevier, Amsterdam.

Mabberley D.J. (1987) The plant-book. Cambridge University Press, Cambridge, New York.

- Marshall H.L., Geider R.J. & Flynn K.J. (2000) A mechanistic model of photoinhibition. *New Phytologist* 145, 347–359.
- McDonald, A.J.S., Lohammar T. & Ericsson A. (1986) Growth response to step-decrease in nutrient availability in small birch (*Betula pendula* Roth). *Plant, Cell and Environment* 9, 427–432.
- Mendelssohn I.A., McKee K.L. & Patrick W.H. (1981) Oxygen Deficiency in *Spartina alterniflora* Roots: Metabolic Adaptation to Anoxia. *Science* 214, 439–441.
- Mommer L., Kroon H. de, Pierik R., Bögemann G.M. & Visser E.J.W. (2005a) A functional comparison of acclimation to shade and submergence in two terrestrial plant species. *New Phytologist* 167, 197-206.

- Mommer L., Lenssen J.P.M., Huber H., Visser E.J.W. & Kroon H. de (2006a) Ecophysiological determinants of plant performance under flooding: a comparative study of seven plant families. *Journal of Ecology* 94, 1117–1129.
- Mommer L., Pedersen O. & Visser, E.J.W. (2004) Acclimation of a terrestrial plant to submergence facilitates gas exchange under water. *Plant, Cell and Environment* 27, 1281–1287.
- Mommer L., Pons T.L. & Visser E.J.W. (2006b) Photosynthetic consequences of phenotypic plasticity in response to submergence: *Rumex palustris* as a case study. *Journal of Experimental Botany* 57, 283-290.
- Mommer L., Pons T.L., Wolters-Arts M., Venema J.H. & Visser E.J.W. (2005b) Submergence-Induced Morphological, Anatomical, and Biochemical Responses in a Terrestrial Species Affect Gas Diffusion Resistance and Photosynthetic Performance. *Plant Physiology* 139, 497-508.
- Mommer L. & Visser E.J.W. (2005) Underwater Photosynthesis in Flooded Terrestrial Plants: A Matter of Leaf Plasticity. *Annals of Botany* 96, 581-589.
- Mommer L., Wolters-Arts M., Andersen C., Visser E.J.W. & Pedersen O. (2007) Submergence-induced leaf acclimation in terrestrial species varying in flooding tolerance. *New Phytologist* 176, 337-345.
- Monk L.S., Fagerstedt K.V. & Crawford R.M.M. (1987) Superoxide Dismutase as an Anaerobic Polypeptide. A Key Factor in Recovery from Oxygen Deprivation in *Iris pseudacorus? Plant Physiology* 85, 1016–1020.
- Mustroph A., Boamfa E.I., Laarhoven L.J.J., Harren F.J.M., Pörs Y. & Grimm B. (2006) Organ specific analysis of the anaerobic primary metabolism in rice and wheat seedlings II: light exposure reduces needs for fermentation and extends survival during anaerobiosis. *Planta* 225, 139–152.
- Pammenter N.W., Drennan P.M. & Smith V.R. (1986) Physiological and Anatomical Aspects of Photosynthesis of Two Agrostis Species at a Sub-Antarctic Island. New Phytologist 102, 143–160.
- Papenmeier S., Schrottke K. & Bartholomä A. (2014) Over time and space changing characteristics of estuarine suspended particles in the German Weser and Elbe estuaries. *Journal of Sea Research* 85, 104–115.
- Pedersen O. & Colmer T.D. (2012) Physical gills prevent drowning of many wetland insects, spiders and plants. *The Journal of Experimental Biology* 215, 705–709.
- Pedersen O., Colmer T.D. & Sand-Jensen K. (2013) Underwater Photosynthesis of Submerged Plants Recent Advances and Methods. *Frontiers in Plant Science* 4. Zugriff am 28.05.2013 unter http://journal.frontiersin.org/ Journal/10.3389/fpls.2013.00140/full.
- Pedersen O., Rich S.M. & Colmer T.D. (2009) Surviving floods: leaf gas films improve O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> exchange, root aeration, and growth of completely submerged rice. *The Plant Journal* 58, 147–156.
- Pedersen O., Vos H. & Colmer T.D. (2006) Oxygen dynamics during submergence in the halophytic stem succulent *Halosarcia pergranulata*. *Plant, Cell and Environment* 29, 1388-1399.
- Peek M.S., Russek-Cohen E., Wait D.A. & Forseth I.N. (2002) Physiological response curve analysis using nonlinear mixed models. *Oecologia* 132, 175-180.
- Perata P. & Voesenek L.A.C.J. (2007) Submergence tolerance in rice requires Sub1A, an ethylene-responsefactor-like gene. *Trends in Plant Science* 12, 43–46.
- Pierik R., Tholen D., Poorter H., Visser E.J.W. & Voesenek L.A.C.J. (2006) The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science* 11, 176–183.
- Platt T., Gallegos C.L. & Harrison W.G. (1980) Photoinhibition of Photosynthesis in Natural Assemblages of Marine Phytoplankton. *Journal of Marine Research* 38, 687–701.
- Poorter H., Niinemets Ü., Poorter L., Wright I.J. & Villar R. (2009) Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist* 182, 565–588.
- Poorter H., Niklas K.J., Reich P.B., Oleksyn J., Poot P. & Mommer L. (2012) Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist* 193, 30–50.
- Portis A.R. (1992) Regulation of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 415–437.

- Potvin C., Lechowicz M.J. & Tardif S. (1990) The Statistical Analysis of Ecophysiological Response Curves Obtained from Experiments Involving Repeated Measures. *Ecology* 71, 1389-1400.
- Raskin I. & Kende H. (1983) How does deep water rice solve its aeration problem. Plant Physiology 72, 447–454.
- Revsbech N.P., Pedersen O., Reichardt W. & Briones A. (1999) Microsensor analysis of oxygen and pH in the rice rhizosphere under field and laboratory conditions. *Biology and Fertility of Soils* 29, 379–385.
- Ricard B., Couee I., Raymond P., Saglio P.H., Saintges V. & Pradet A. (1994) Plant-Metabolism under hypoxia and anoxia. *Plant Physiology and Biochemistry* 32, 1–10.
- Rich S.M., Pedersen O., Ludwig M. & Colmer T.D. (2013) Shoot atmospheric contact is of little importance to aeration of deeper portions of the wetland plant *Meionectes brownii*; submerged organs mainly acquire O<sub>2</sub> from the water column or produce it endogenously in underwater photosynthesis. *Plant, Cell and Environment* 36, 213–223.
- Ritchie R.J. (2008) Fitting light saturation curves measured using modulated fluorometry. *Photosynthesis Research* 96, 201–215.
- Rufty T.W., Huber S.C. & Volk R.J. (1988) Alterations in Leaf Carbohydrate Metabolism in Response to Nitrogen Stress. *Plant Physiology* 88, 725–730.
- Rundle H.D. & Nosil P. (2005) Ecological speciation. Ecology Letters 8, 336–352.
- Russell D.A., Wong D.M.L. & Sachs M.M. (1990) The Anaerobic Response of Soybean. *Plant Physiology* 92, 401–407.
- Sachs M.M., Subbaiah C.C. & Saab I.N. (1996) Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *Journal of Experimental Botany* 47, 1-15.
- Sand-Jensen K. & Frost-Christensen H. (1999) Plant growth and photosynthesis in the transition zone between land and stream. *Aquatic Botany* 63, 23–35.
- Sarkar R.K. & Bhattacharjee B. (2011) Rice Genotypes with SUB1 QTL Differ in Submergence Tolerance, Elongation Ability During Submergence, and Re-generation Growth at Re-emergence. *Rice* 59, 313.
- Schlüter U. & Crawford R.M.M. (2003) Metabolic adaptation to prolonged anoxia in leaves of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). *Physiologia Plantarum* 117, 492–499.
- Schmeil O., Fitschen J. & Seybold S. (2006) Flora von Deutschland und angrenzender Länder. Ein Buch zum Bestimmen der wild wachsenden und häufig kultivierten Gefäßpflanzen. Quelle & Meyer, Wiebelsheim.
- Scholz H. (2007) Questions about Indigenous Plants and Anecophytes. Taxon 56, 1255.
- Schreiber U., Bilger W. & Neubauer C. (1994) Chlorophyll Fluorescence as a Nonintrusive Indicator for Rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis. In *Ecophysiology of Photosynthesis* (Hrsg. E.-D. Schulze & M.M. Caldwell), pp. 49–70. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Schreiber U., Klughammer C. & Kolbowski J. (2012) Assessment of wavelength-dependent parameters of photosynthetic electron transport with a new type of multi-color PAM chlorophyll fluorometer. *Photosynthesis Research* 113, 127–144.
- Schreiber U., Schliwa U. & Bilger W. (1986) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10, 51-62.
- Setter T.L. & Waters I. (2003) Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley and oats. *Plant and Soil* 253, 1–34.
- Siebke K., Caemmerer S. von, Badger M. & Furbank R.T. (1997) Expressing an RbcS antisense gene in transgenic *Flaveria bidentis* leads to an increased quantum requirement for CO<sub>2</sub> fixed in Photosystems I and II. *Plant Physiology* 115, 1163–1174.
- Smart R.M. & Barko J.W. (1985) Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments. *Aquatic Botany* 21, 251–263.
- Strommer J. (2011) The plant ADH gene family. The Plant Journal 66, 128-142.

- Talling J.F. (1957) The Phytoplankton Population as a Compound Photosynthetic System. *New Phytologist* 56, 133–149.
- Thomson C.J., Armstrong W., Waters I. & Greenway H. (1990) Aerenchyma formation and associated oxygen movement in seminal and nodal roots of wheat. *Plant, Cell and Environment* 13, 395–403.
- Tournaire-Roux C., Sutka M., Javot H., Gout E., Gerbeau P., Luu D.T., Bligny R. & Maurel C. (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425, 393-397.
- van Veen H., Mustroph A., Barding G.A., Vergeer-van Eijk M., Welschen-Evertman R.A.M., Pedersen O., Visser E.J.W., Larive C.K., Pierik R., Bailey-Serres J., Voesenek L.A.C.J. & Sasidharan R. (2013) Two *Rumex* Species from Contrasting Hydrological Niches Regulate Flooding Tolerance through Distinct Mechanisms. *The Plant Cell* 25, 4691–4707.
- Verboven P., Pedersen O., Ho Q.T., Nicolai B.M. & Colmer T.D. (2014) The mechanism of improved aeration due to gas films on leaves of submerged rice. *Plant, Cell and Environment*. Zugriff am 19.03.2014 unter http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pce.12300/full.
- Vervuren P.J.A., Beurskens S.M.J.H. & Blom C.W.P.M. (1999) Light acclimation, CO<sub>2</sub> response and long-term capacity of underwater photosynthesis in three terrestrial plant species. *Plant, Cell and Environment* 22, 959–968.
- Vervuren P.J.A., Blom C. & Kroon H. de (2003) Extreme flooding events on the Rhine and the survival and distribution of riparian plant species. *Journal of Ecology* 91, 135-146.
- Voesenek L.A.C.J., Colmer T.D., Pierik R., Millenaar F.F. & Peeters A.J.M. (2006) How plants cope with complete submergence. *New Phytologist* 170, 213–226.
- Voesenek L.A.C.J., Rijnders, J.H.G.M., Peeters A.J.M., van de Steeg H.M. & Kroon H. de (2004) Plant Hormones Regulate Fast Shoot Elongation Under Water: From Genes to Communities. *Ecology* 85, 16–27.
- Voesenek L.A.C.J. & Sasidharan R. (2013) Ethylene and oxygen signalling drive plant survival during flooding. *Plant Biology* 15, 426–435.
- Wells C.L. & Pigliucci M. (2000) Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3, 1–18.
- Wetson A., Zorb C., John E. & Flowers T. (2012) High phenotypic plasticity of *Suaeda maritima* observed under hypoxic conditions in relation to its physiological basis. *Annals of Botany* 109, 1027–1036.
- Winkel A., Colmer T.D., Ismail A.M. & Pedersen O. (2013) Internal aeration of paddy field rice (*Oryza sativa*) during complete submergence importance of light and floodwater O<sub>2</sub>. *New Phytologist* 197, 1193–1203.
- Winkel A., Colmer T.D. & Pedersen O. (2011) Leaf gas films of *Spartina anglica* enhance rhizome and root oxygen during tidal submergence. *Plant, Cell and Environment* 34, 2083–2092.
- Winkel A., Pedersen O., Ella E., Ismail A.M. & Colmer T.D. (2014) Gas film retention and underwater photosynthesis during field submergence of four contrasting rice genotypes. *Journal of Experimental Botany*. Zugriff am 14.05.2014 unter http://jxb.oxfordjournals.org/content/early/2014/04/22/ jxb.eru166.full.
- Xie Y. & Wu R. (1989) Rice alcohol dehydrogenase genes: anaerobic induction, organ specific expression and characterization of cDNA clones. *Plant Molecular Biology* 13, 53–68.
- Xu K., Xu X., Fukao T., Canlas P., Maghirang-Rodriguez R., Heuer S., Ismail A.M., Bailey-Serres J., Ronald P.C. & Mackill D.J. (2006) Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature* 442, 705–708.
- Yamauchi T., Watanabe K., Fukazawa A., Mori H., Abe F., Kawaguchi K., Oyanagi A. & Nakazono M. (2014) Ethylene and reactive oxygen species are involved in root aerenchyma formation and adaptation of wheat seedlings to oxygen-deficient conditions. *Journal of Experimental Botany* 65, 261–273.

#### Internetquellen

Daten der FGG Elbe. letzter Zugriff am 01.06.2014 unter http://www.elbe-datenportal.de/ FisFggElbe/content/start/BesucherUnbekannt.action.

- www.floraweb.de. Zugriff am 28.06.2010 unter http://floraweb.de/webkarten/karte.html?taxnr=1904 und http://floraweb.de/webkarten/karte.html?taxnr=1906.
- Gutz I.G.R. (2013). CurTiPot pH and Acid-base Titration Curves: Analysis and Simulation Software, Version 3.6.1. Zugriff am 16.06.2013 unter http://www2.iq.usp.br/docente/gutz/Curtipot\_.html.

# Danksagungen

Nach diesen vier Jahren Promotionszeit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben. Zunächst möchte ich mich für die Finanzierung meiner Promotion durch die Forschungs- und Wissenschaftsstiftung Hamburg und die Joachim Herz Stiftung innerhalb der Landesgraduiertenschule ESTRADE im Rahmen der Hamburger Landesexzellenzinitiative (LExI) bedanken. Ich bedanke mich bei Dieter Hanelt für die Betreuung meiner Arbeit und die Unterstützung in fachlichen Fragen, insbesondere in den Bereichen Photosynthese und PAM-Fluoreszenzmessungen. Kai Jensen möchte ich ebenfalls für die Betreuung meiner Arbeit und die fachliche Unterstützung in den Bereichen "*Deschampsia*" und Ökologie danken. Außerdem danke ich euch für das Vertrauen, dass Ihr mir in der ganzen Zeit entgegen gebracht habt. Ich möchte mich auch bei Klaus von Schwartzenberg für die Mitgestaltung meiner Panel-Meetings als "Panel-Chair" und als Teil meines Thesis-Committees im Rahmen von ESTRADE bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Beteiligten der Graduiertenschule ESTRADE bedanken. Die Zusammenkünfte, Retreats, Winter-School usw. waren immer eine große Motivationshilfe und haben neue Ideen hervorgebracht. Insbesondere möchte ich mich bei Andrea und Tobi für die Organisation von ESTRADE bedanken. Ohne euch wäre ESTRADE nicht möglich gewesen. Ich möchte mich außerdem bei der gesamten AG Zellbiologie für die Unterstützung über die vielen Jahre bedanken. Insbesondere danke ich Elke für die Anfertigung der hervorragenden Blattquerschnitte für meine Arbeit. Bei der AG Angewandte Pflanzenökologie bedanke ich mich für nette Ausflüge und Unternehmungen sowie fachliche Beratung zu Statistikthemen und Freilandversuchen. Danke für die Betreuung des Bullis, Claudia. Bei der AG AMPI möchte ich mich für die Einweisung und Nutzungsmöglichkeit am Mikroskop bedanken und außerdem für zahlreiche nette Zusammenkünfte in der Teeküche. Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitgliedern des Freshwater Labs in Kopenhagen für die herzliche Aufnahme und die Unterstützung während meines dreimonatigen Forschungsaufenthalts. Insbesondere möchte ich mich bei Ole Pedersen für die tolle Unterstützung und die gemeinsame Planung meiner Experimente danken. Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, ohne die ich diese Arbeit nicht hinbekommen hätte. Ich danke vor allem meinen Eltern. Ihr seid die Besten! Außerdem danke ich Volker, den ich erst durch die Horste kennengelernt habe und ohne den diese Arbeit ungleich schwieriger und die letzten vier Jahre vor allem nicht annähernd so unterhaltsam gewesen wären. Es war wirklich ein glücklicher Zufall, dass wir dieses Thema zusammen bearbeiten durften.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz besonders bei Kathrin bedanken, dafür, dass du immer für mich da bist und mich die ganze Zeit unterstützt hast. Ohne deine Unterstützung hätte ich diese Arbeit nicht schreiben können. Danke!

#### Anhang 1: Wasseranalyse des Leitungswassers

### Chemisch-physikalische Analyse des Reinwassers 2012 Grundwasserwerk Baursberg



#### Stoffe/Kennwerte Maßeinheit Grenzwert\* Mittelwert Min. Untere Grenze des Max. 2012 praktischen Arbeitsbereiches 11,1 10.2 Temperatur °C 12.1 Leitfähigkeit bei 25°C µS/cm 2790 820 775 900 5 pH-Wert 6,5 - 9,5 7,7 7,8 7.8 Färbung (SAK 436 nm) 1/m 0.5 0,1 0.1 0.2 0.1 Trübung NTU 1,0 0,21 0,05 0,47 0,02 Sauerstoff 9.1 8.6 10.0 0.1 mg/l Gesamthärte °dH 14,8 14.4 15,2 0,14 -Karbonathärte °dH 8,1 7,7 8,7 0,1 0,09 0,12 KB8,2 0.01 mmol/l 0,11 KS4,3 mmol/l 2,9 2,7 3,1 0,04 Härtebereich\*\* hart Kationen Calcium 91 95 mg/l 93 1 Magnesium mg/l 8 7 9 1 200 58 89 Natrium mg/l 70 0,5 Kalium 2,6 2,3 3,3 0,5 mg/l 0,200 Eisen mg/l 0,01 n.n. 0,06 0,01 Mangan 0,050 0,01 mg/l n.n. n.n. n.n. 0,05 Ammonium mg/l 0,50 n.n. n.n. n.n. Anionen Chlorid 250 mg/l 101 92 120 1 Sulfat mg/l 250 122 116 131 1 Nitrat 50 3,0 1,2 4,1 0,2 mg/l 0,50 0,01 Nitrit mg/l n.n. n.n. n.n. 0,06 Fluorid mg/l 1,5 0,07 0,07 0,01 Bromat mg/l 0,010 0,01 n.n. n.n. n.n. Spurenelemente Aluminium 0,200 n.n. n.n. n.n. 0,01 mg/l Antimon 0,0050 0,0001 mg/l n.n. n.n. n.n. 0,010 0,0005 Arsen mg/l n.n. n.n. n.n. Blei mg/l 0,025 n.n. 0,001 n.n. n.n. Cadmium 0.0030 0.0001 mg/l n.n. n.n. n.n. Chrom mg/l 0,050 0,001 n.n. n.n. n.n. 0,005 Kupfer mg/l 2,0 n.n. n.n. n.n. Nickel 0.020 0.001 mg/l n.n. n.n. n.n. Quecksilber mg/l 0,0010 n.n. n.n. 0,0001 n.n. Selen 0,010 0,001 mg/l n.n. n.n. n.n. Uran mg/l 0,010 0,0005 0,0002 0,001 0,0001 Zink mg/l n.n. 0,02 n.n. n.n. 0,05 1,0 0,06 0,05 Bor mg/l 0.07 TOC 1,0 0,9 1,3 0,1 mg/l 0,050 Cyanid mg/l 0,01 n.n. n.n. n.n. 0,000010 0,000005 Benzo(a)pyren mg/l n.n. n.n. n.n. Benzol 0,0010 0,0005 mg/l n.n. n.n. n.n. 1,2-Dichlorethan 0,0030 0,001 mg/l n.n. n.n. n.n. SummeTri-/Tetrachlorethen mg/l 0,010 n.n. n.n. n.n. 0,0002 Summe Trihalogenmethane 0,001 mg/l 0,010 n.n. n.n. n.n.

Organische Umweltchemikalien, wie z.B. Pestizide, organische Chlorverbindungen und polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, auf die regelmäßig untersucht wurde, lagen deutlich unter den gesetzlichen Grenzwerten bzw. waren nicht nachweisbar. Die gesetzlich festgeschriebenen Grenzwerte mikrobiologischer Parameter wurden stets deutlich unterschritten.

\* nach Trinkwasserverordnung 2001 in der Fassung vom 28.11.2011 \*\* nach Wasch- und Reinigungsmittelgesetz vom 29.04.2007

Hamburger Wasserwerke Billhorner Deich 2×20539 Hamburg Labor-Telefon: 040/7888-82512

## Anhang 2: Zusammensetzung einer modifizierten Hoagland Nährlösung

Substanz	Molekular- gewicht	Konzentratio der Stamm- lösung	n Konzentration der Stamm- lösung	Masse in der Stamm- lösung	Volumen der Stamm- lösung	Volumen der Stamm- lösung pro Liter vollkonz. Lösung	Volumen der Stamm- lösung pro 10 L ½ konz. Lösung	Substanz	Konzentration in ½ konz. Lösung
	g mol⁻¹	mM	g L <sup>-1</sup>	g	mL	mL	. mL		μΜ
Puffer									
MES	195.24	625	122.03	122.03	1,000	) 8	3 40	MES	2,500
Makronährstoffe									
KNO₃	101.10	2,000	202.20	101.10	500	) 3	3 15	N	16,000
$Ca(NO_3)_2 \bullet 4H_2O$	236.16	2,000	472.32	118.08	250	) 2	2 10	К	6,000
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	115.08	1,000	115.08	28.77	250	) 2	2 10	Ca	4,000
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	246.48	1,000	246.48	24.65	100		1 5	Р	2,000
								S	1,000
								Mg	1,000
Mikronnährstoffe									
$Na_2SiO_3 \bullet 5H_2O$	212.10	1,000	212.10	53.03	250	) 2	2 10	Si	1,000
FeEDTA (Ferric sodium EDTA)	367.05	37.5	13.76	3.44	250	) <u></u>	1 5	Fe	37.5
KCI	74.55	25	1.864	0.932	: )			Cl	50
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.83	12.5	0.773	0.387	,			В	25
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	169.01	1.0	0.169	0.085	;			Mn	2.0
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	287.54	1.0	0.288	0.144	↓ <b>}</b> 500	) 2	2 10	Zn	2.0
CuSO <sub>4</sub>	159.61	0.25	0.040	0.020				Cu	0.5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	241.95	0.25	0.060	0.030	)			Мо	0.5
NiSO <sub>4</sub> •6H <sub>2</sub> O	262.86	0.25	0.066	0.033	; J			Ni	0.5

(Quelle: modifiziert nach Taiz L, Zeiger E; 2007; **Plant Physiology – Das Original mit Übersetzungshilfen**; 4. Auflage; Springer Verlag, Berlin.)