UFZ-UMWELTFORSCHUNGSZENTRUM LEIPZIG-HALLE GMBH

UFZ-Bericht

UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht

Nr. 25/2000 Dissertation

Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von atmosphärischen Schadstoffen auf den Stickstoffmetabolismus von *Triticum aestivum*(C_3-Pflanze) und *Zea Mays* (C_4-Pflanze)

Gewässerforschung Magdeburg RS

Doreen Möcker

UFZ-Sektion Gewässerforschung Magdeburg 01-1197MA

ISSN 0948-9452

Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von atmosphärischen Schadstoffen auf den Stickstoffmetabolismus von *Triticum aestivum* (C_3-Pflanze) und *Zea mays* (C_4-Pflanze)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Diplom-Biochemikerin Doreen Möcker
geb. am 05. Oktober 1969 in Neindorf-Beckendorf

Archiv

Gutachter: 1. Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerd-Joachim Krauß
2. Herr PD Dr. rer. nat. habil. Klaus Jung
3. Herr Prof. Dr. rer. nat. habil. Bernd Markert

Halle (Saale), den 12. Januar 2000

UFZ-Umweltforschungszentrum
Leipzig-Halle GmbH
Zentralbibliothek
Permoserstraße 15
04318 Leipzig
01-1193

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	I
Verzeichnis der Abbildungen	II
Verzeichnis der Tabellen	IV
1. Einleitung	1
1.1. Problemstellung und Zielsetzung	1
1.2. Wirkungen atmosphärischer Schadstoffe auf Pflanzen	3
1.3. C_3- und C_4-Typ der Photosynthese	9
2. Material und Methoden	13
2.1. Pflanzenmaterial	13
2.1.1. Pflanzenanzucht und N-Düngungsexperimente	13
2.1.2. $^{15}NO_2$-Exposition	14
2.1.3. Ozonexposition	15
2.2. Enzymatische Bestimmungen	17
2.2.1. Gewinnung des Rohenzymextraktes für enzymatische Bestimmungen	17
2.2.2. Bestimmung der NADH-Nitratreduktaseaktivität (NADH-NR)	17
2.2.3. Bestimmung der Nitritreduktaseaktivität (NiR)	18
2.2.4. Bestimmung der Glutaminsynthetaseaktivität (GS)	18
2.2.5. Bestimmung der NADH-Glutamatdehydrogenaseaktivität (NADH-GDH)	19
2.3. Proteinbestimmung	19
2.4. Bestimmung der Pigmentgehalte	20
2.5. Nitratbestimmung	20
2.6. Nitritbestimmung	20
2.7. Ammoniumbestimmung	20
2.8. Stickstoffanalytik	21
2.8.1. Die Auftrennung in N-Fraktionen	21
2.8.2. Kjeldahl-Aufschluß	21
2.8.3. Quantitative Stickstoffbestimmung durch Wasserdampfdestillation	22
2.9. Bestimmung der ^{15}N-Häufigkeiten	22
2.9.1. Grundlagen der ^{15}N-Tracertechnik	22
2.9.2. Emissionsspektrometrische ^{15}N-Bestimmung	23
2.10. HPLC-Analyse freier Aminosäuren	24
2.10.1. Gewinnung der Extrakte	24
2.10.2. Derivatisierung	25
2.10.3. HPLC	25
2.11. Statistik	26

3. Ergebnisse 27

3.1. Wirkungen verschiedener Nitrat- bzw. Ammoniumkonzentrationen auf den pflanzlichen Stoffwechsel 27
3.1.1. Einfluß auf Biomasseproduktion und Vitalitätsparameter (Pigment- und Proteingehalte) 27
3.1.2. Einfluß auf die Aktivitäten stickstoffassimilierender Enzyme 30
3.1.3. Ammoniumgehalte 36
3.1.4. Nitratgehalte 37
3.1.5. Nitritgehalte 37
3.1.6. Gesamtstickstoffgehalte 38
3.1.7. Ergebnisse der ^{15}N-Tracerversuche 40
3.1.8. Ergebnisse der Aminosäurenanalyse 44
3.2. Ergebnisse der $^{15}NO_2$-Exposition 47
3.2.1. Enzymaktivitäten, Pigment-, Ammonium- und Nitritgehalte 47
3.2.2. $^{15}NO_2$-Aufnahme 49
3.2.3. Verteilung der ^{15}N-Exzeßmasse auf die Pflanzenfraktionen 50
3.2.4. Vergleich der ^{15}N-Exzeßhäufigkeiten in unterschiedlichen N-Fraktionen 52
3.3. Ergebnisse der Ozonexposition 54
3.3.1. Enzymaktivitäten, Gehalt an löslichem Protein, Ammonium und Pigmenten 54
3.3.2. Ergebnisse der ^{15}N-Tracerexperimente 55

4. Diskussion 57

4.1. Düngungsexperimente über das Bodensubstrat 58
4.2. $^{15}NO_2$-Exposition 64
4.3. Ozonexposition 68
4.4. Kombinationswirkungen verschiedener Stressoren 71

5. Zusammenfassung 75

6. Literatur 80

Eidesstattliche Erklärung

Danksagung

Lebenslauf

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADAM	1-Aminoadamantan
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Chl	Chlorophyll
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
$FAD/FADH_2$	Flavinadenindinukleotid
FM	Frischmasse
FMOC	9-Fluorenylmethylchloroformat
GDH	Glutamatdehydrogenase
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GOGAT	Glutamatsynthase
GS	Glutaminsynthetase
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
LP	lösliche Proteinfraktion
$NAD^+/NADH$	Nikotinsäureamidadenindinukleotid
NiR	Nitritreduktase
NO_x	Stickoxide (Stickstoffdioxid und - monoxid)
NPN	Nichtproteinstickstofffraktion
NR	Nitratreduktase
PEPC	Phosphoenolpyruvatcarboxylase
Pro	Prolin
PVP	Polyvinylpyrrolidon
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
Ser	Serin
SP	Strukturproteinfraktion
TCA	Trichloressigsäure
TM	Trockenmasse

Verzeichnis der Abbildungen

Seite

Abb. 3.1 Trockenmasse pro Pflanze in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=20) 27

Abb. 3.2 Pigmentgehalte in Blättern von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6) 28

Abb. 3.3 Gehalte an löslichem Protein in Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6) 29

Abb. 3.4 NADH-Nitratreduktaseaktivitäten in Weizen- und Maisblättern in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6) 30

Abb. 3.5 Nitritreduktaseaktivitäten in Blättern von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6) 31

Abb. 3.6 Glutaminsynthetaseaktivitäten aus Blättern von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6) 32

Abb. 3.7 Glutaminsynthetaseaktivitäten aus Wurzeln von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6) 33

Abb. 3.8 NADH-Glutamatdehydrogenaseaktivitäten aus Blättern von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6) 34

Abb. 3.9 NADH-Glutamatdehydrogenaseaktivitäten aus Wurzeln von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6) 35

Abb: 3.10 Einfluß der N-Versorgung auf die Ammoniumgehalte in Blättern und Wurzeln von Weizen und Mais (n=6) 36

Abb. 3.11 Einfluß der N-Versorgung auf die Nitratgehalte in Blättern von Weizen und Mais (n=6) 37

Abb. 3.12 Stickstoffgehalte pro g Trockenmasse in Weizen und Mais (Gesamtpflanze) in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6) 38

Abb. 3.13 Stickstoffgehalte in verschiedenen Pflanzenfraktionen von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6) 39

Abb. 3.14 ^{15}N-Exzeßmassen pro g Trockenmasse (Gesamtpflanze) bei Weizen und Mais in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle (n=6) 40

Seite

Abb. 3.15 Vergleich der Nitrataufnahme aus $K^{15}NO_3$ und $NH_4{}^{15}NO_3$(n=6).....41

Abb 3.16 Prozentuale Verteilung der ^{15}N-Markierung auf die Pflanzenfraktionen von Weizen (n=6) 42

Abb. 3.17 Prozentuale Verteilung der ^{15}N-Markierung auf die Pflanzenfraktionen von Mais (n=6) 43

Abb. 3.18 ^{15}N-Gehalte pro Weizen- bzw. Maispflanze nach 8h $^{15}NO_2$-Exposition (10,25 Atom%) in Abhängigkeit von $^{15}NO_2$-Expositionskonzentration und N-Angebot im Bodensubstrat (n=6) 49

Abb. 3.19 ^{15}N-Gehalte in Weizen- und Maispflanzen pro Blattflächeneinheit nach 8 h $^{15}NO_2$-Exposition (10,25 Atom%) in Abhängigkeit von $^{15}NO_2$-Expositionskonzentration und N-Angebot im Bodensubstrat (n=6) 50

Abb. 3.20 Verteilung der ^{15}N-Exzeßmasse auf verschiedene Pflanzenfraktionen nach 8 h $^{15}NO_2$-Exposition (25 ppb) in Abhängigkeit von der Nitrat-Düngung und dem Erntezeitpunkt (n=4) 51

Abb. 3.21 ^{15}N-Häufigkeiten in N-Fraktionen von Weizenblättern bzw. -stengeln nach 8 h $^{15}NO_2$-Exposition (10,25 Atom%) in Abhängigkeit vom Nitratangebot im Bodensubstrat und dem Erntezeitpunkt (n=4) 52

Abb. 3.22 ^{15}N-Häufigkeiten in N-Fraktionen von Maisblättern bzw. -stengeln nach 8 h $^{15}NO_2$-Exposition (10,25 Atom%) in Abhängigkeit vom Nitratangebot im Bodensubstrat und dem Erntezeitpunkt (n=4) 53

Abb. 3.23 Einfluß von Ozon auf den Einbau von $^{15}NO_3^-$ in N-Fraktionen von Weizen- und Maisblättern (TN: Total N, SP: Strukturprotein, LP: lösliches Protein, NPN: Nichtprotein-N) (n=4) 55

Abb. 3.24 Einfluß von Ozon auf den Einbau von $^{15}NH_4^+$ in N-Fraktionen von Weizen- und Maisblättern (TN: Total N, SP: Strukturprotein, LP: lösliches Protein, NPN: Nichtprotein-N) (n=4) 56

Verzeichnis der Tabellen

Seite

Tab. 1.1 Schadstoffwirkung auf verschiedenen Organisationsebenen (nach Fuhrer 1996) 4

Tab. 1.2 Die wichtigsten biochemischen, physiologischen und strukturellen Unterschiede zwischen C_3- und C_4-Pflanzen (nach Mohr und Schopfer 1992, Kleber und Schlee 1992, Oaks 1994) 10

Tab. 2.1 Zusammensetzung der Nährlösung für die Pflanzenanzucht (N-frei, pH 6,0) 13

Tab. 3.1 Sproß/Wurzel-Verhältnisse von Weizen- und Maispflanzen in Abhängigkeit von der N-Versorgung (n=20) 28

Tab. 3.2 Gehalte an freien Aminosäuren in Weizenpflanzen in Abhängigkeit von der N-Versorgung (n=6) 45

Tab. 3.3 Gehalte an freien Aminosäuren in Maispflanzen in Abhängigkeit von der N-Versorgung (n=6) 46

Tab. 3.4 Enzymaktivitäten in Blättern von Weizen und Mais nach 8 h $^{15}NO_2$-Exposition (25 ppb) im Vergleich zu unbegasten Kontrollpflanzen
Variante I: 50 kg N/ha in Nitratform gegeben
Variante II: 200 kg N/ha in Nitratform gegeben
(n=4) 47

Tab. 3.5 Pigment- und Ammoniumgehalte in Blättern von Weizen und Mais nach 8 h $^{15}NO_2$- Exposition (25 ppb) im Vergleich zu unbegasten Kontrollpflanzen
Variante I: 50 kg N/ha in Nitratform gegeben
Variante II: 200 kg N/ha in Nitratform gegeben
(n=4) 48

Tab. 3.6 Aktivitäten N-assimilierender Enzyme und Gehalte an löslichem Protein, Ammonium und Pigmenten in Blättern von Weizen und Mais unter Ozoneinfluß (n=4) 54

1. Einleitung

1.1. Problemstellung und Zielsetzung

Die chemische Zusammensetzung der Atmosphäre wird durch anthropogene Aktivitäten (Industrie, Landwirtschaft, Kraftfahrzeugverkehr) beeinflußt. Insbesondere die Energiegewinnung aus fossilen Brennstoffen verursacht die Emission von Kohlendioxid (CO_2), Schwefeldioxid (SO_2), Stickoxiden (NO, NO_2) und verschiedener organischer Verbindungen. Primäre Emissionen können in der Atmosphäre Reaktionen eingehen und sekundäre Folgeprodukte bilden. Als Beispiele hierfür sind die Oxidation von Stickstoffmonoxid zu Stickstoffdioxid sowie die photochemische Reaktion der freigesetzten Stickoxide mit dem Luftsauerstoff unter Bildung von Ozon (O_3) zu nennen.

Während die SO_2-Belastung der Atmosphäre in der Bundesrepublik Deutschland durch die Ausrüstung von Kraftwerks- und Industrieanlagen mit wirksamen Filtereinrichtungen erheblich gesenkt werden konnte (UBA 1990), sind Stickoxide und Ozon infolge des ständig steigenden Kraftfahrzeugverkehrs von unvermindert hoher Bedeutung (UBA 1999). Diese Veränderung in der Zusammensetzung der Luftschadstoffe konnte auch in den neuen Bundesländern in bemerkenswert kurzer Zeit beobachtet werden, was auf die tiefgreifende Umstrukturierung von Industrie und Wirtschaft und das explosionsartig gestiegene Verkehrsaufkommen zurückgeführt wird (SANA-Projekt 1992).

Die gegenwärtig hohen troposphärischen Schadgaskonzentrationen (O_3, NO_x) stellen ein erhebliches Gefährdungspotential für das pflanzliche Wachstum dar (vgl. 1.2.). Schadgase können nach trockener bzw. feuchter Deposition über Sproß oder Wurzeln der Pflanzen aufgenommen werden und greifen in komplexer Weise in den Stoffwechsel ein. Folgen können Wachstumsstörungen, Ertragsverluste bei Kulturpflanzen bzw. die nachhaltige Veränderung von Ökosystemen sein.
Mit der hier vorgestellten Arbeit soll ein Beitrag zur Einschätzung dieses Gefährdungspotentials für das pflanzliche Wachstum geleistet werden.

Allerdings reagiert nicht jede Art in gleicher Weise auf Schadstoffeinträge; es bestehen zum Teil erhebliche Unterschiede in der Schadstofftoleranz (Barnes et al. 1999). Die genauen Mechanismen und Faktoren, welche die Sensitivität einer Pflanzenspezies gegenüber Spurengasbelastungen bestimmen, sind bislang noch nicht befriedigend geklärt. Es wird jedoch vermu-

tet, daß morphologische, physiologische und biochemische Merkmale das Toleranzverhalten in erheblichem Maße beeinflussen. Um generelle Aussagen über Schadgaseffekte auf Pflanzen treffen zu können, ist es daher unabdingbar, die Reaktionen verschiedener, sich gerade in diesen Eigenschaften unterscheidender Arten zu vergleichen.

Die konkrete Zielstellung dieser Arbeit bestand daher darin, die Wirkungen umweltrelevanter O_3- und NO_2-Konzentrationen auf Pflanzen, die unterschiedliche Photosynthesetypen (C_3-, C_4-Typ) repräsentieren, vergleichend zu untersuchen und Aussagen über Zusammenhänge zwischen artspezifischer Reaktion auf die Schadgasbelastung und dem Stoffwechseltyp zu treffen.
Da sich gerade C_3- und C_4-Pflanzen in einer Vielzahl biochemischer, physiologischer und struktureller Merkmale unterscheiden, die für die Sensitivität gegenüber Schadgasen bedeutsam sein könnten (vgl. 1.3.), erschienen sie als besonders geeignet, um detailliertere Kenntnisse hinsichtlich der Eigenschaften zu erhalten, welche die Schadstofftoleranz einer Art bestimmen.

Um kausale Zusammenhänge erfassen zu können, wurden die Expositionsexperimente unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Besonderer Wert wurde auf die Wahl realistischer Expositionskonzentrationen gelegt, um die Übertragbarkeit der Resultate auf tatsächliche Vorgänge in der Umwelt zu gewährleisten. In diesem Punkt unterscheidet sich die hier vorgestellte Arbeit von zahlreichen früher veröffentlichten Untersuchungen (Tischner et al. 1988, VDI 1989, Shimazaki et al. 1992), die mit weit überhöhten Schadstoffdosen durchgeführt wurden.

C_3- und C_4-Pflanzen unterscheiden sich im C-Stoffwechsel (CO_2-Fixierung), der eng mit dem N-Metabolismus verbunden ist. Dem Stickstoffstoffwechsel kommt eine zentrale Rolle in der Pflanze zu, woraus seine Bedeutung für Wachstum, Konkurrenzfähigkeit und Ertrag resultiert. Da NO_x-Expositionen primär in den Stickstoffmetabolismus der Pflanze eingreifen und auch für Ozonexpositionen Hinweise auf eine Beeinflussung des N-Stoffwechsels vorliegen (Manderscheid et al. 1992, Jung et al. 1994, Wellburn et al. 1996, Pausch et al. 1996) erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine Konzentration auf die Untersuchung von Parametern des Stickstoffmetabolismus.

Mit Hilfe der ^{15}N-Tracertechnik sollte die Stickstoffaufnahme und -verteilung innerhalb der Pflanze und der Einbau in unterschiedliche N-Pools der pflanzlichen Biomasse analysiert werden. Als ^{15}N-markierte Stickstoffquellen wurden unterschiedliche Konzentrationen von $^{15}NO_2$, $^{15}NH_4Cl$, $K^{15}NO_3$ bzw. $NH_4{}^{15}NO_3$ eingesetzt.
Weiterhin wurden die für die Stickstoffverwertung verantwortlichen Schlüsselenzyme Nitratreduktase, Nitritreduktase, Glutaminsynthetase und Glutamatdehydrogenase sowie die Gehalte verschiedener Metabolite (Nitrat, Nitrit, Ammonium, Aminosäuren) in die Untersuchungen einbezogen.

Von der Analyse der Parameter des N-Metabolismus wurden entscheidende Informationen erwartet, die eine differenzierte Beurteilung der Reaktion der beiden Pflanzentypen auf Stickstoff- und Ozondepositionen ermöglichen und Rückschlüsse auf die die individuelle Sensitivität bestimmenden Eigenschaften sowie generelle Aussagen zum ökotoxikologischen Gefährdungspotential dieser Schadstoffe erlauben.

1.2. Wirkungen atmosphärischer Schadstoffe auf Pflanzen

Atmosphärische Spurengase können als trockene oder nasse Deposition in die Biosphäre gelangen. Pflanzen stellen eine bedeutende Senke für Spurengase dar, da sie diese über den oberirdischen Sproß absorbieren bzw. nach nasser Deposition in gelöster Form aus dem Boden über die Wurzeln aufnehmen können (Ziegler 1995, Fuhrer 1996). Die Aufnahme über die Blätter ist in erster Linie von der stomatären Leitfähigkeit abhängig; die Aufnahme über die Kutikula spielt in der Regel eine untergeordnete Rolle (Darrall 1989, Kangasjärvi et al. 1994).

Der pflanzliche Stoffwechsel kann daraufhin positiv oder negativ beeinflußt werden, wobei insbesondere SO_2, NO_x und O_3 als phytotoxische Schadstoffe gelten, die in physiologische Prozesse eingreifen und dadurch das pflanzliche Wachstum mindern können (Darrall 1989, Elstner & Hippeli 1995).
Die Art des Schadstoffes sowie die Konzentration und Dauer der Exposition bestimmen die Wirkungen auf den pflanzlichen Stoffwechsel, die sich auf verschiedenen Organisationsebenen manifestieren (Tabelle 1.1).
Grundsätzlich werden akute und chronische Wirkungen auf Schadstoffexpositionen unterschieden. Akute Schäden sind als Folge kurzzeitiger Belastung mit hohen Schadstoffdosen

durch punktuelle oder flächenhafte, für den jeweiligen Schadstoff charakteristische Nekrosen gekennzeichnet. Chronische Wirkungen sind auf Langzeitexpositionen mit niedrigen Konzentrationen zurückzuführen und äußern sich durch Chlorosen und andere vorzeitige Seneszenzerscheinungen. Diese Symptome sind nicht auslöserspezifisch und können kaum von den Wirkungen anderer Streßfaktoren (Pathogenbefall, Mangelernährung, Klimaeinflüsse) abgegrenzt werden (Elstner & Hippeli 1995).

Den sichtbaren Wirkungen sind die latenten Schäden gegenüberzustellen, welche makroskopisch nicht erkennbare Veränderungen darstellen, die die Streßtoleranz der Pflanze jedoch einschränken können.

Tab. 1.1 Schadstoffwirkung auf verschiedenen Organisationsebenen (nach Fuhrer 1996)

Organisationsebene	**Betroffene Prozesse**	**Wichtige Zielgrößen**
Subzellulär	Biochemische Vorgänge Zellinhaltsstoffe	Enzymaktivitäten
Zellen und Gewebe	Biochemische und biophysikalische Vorgänge	Membrampermeabilität Ionenkonzentrationen Elektronentransport
Organe (Blatt, Wurzel, Blüte)	Assimilationsvorgänge Wasser- und Stoffhaushalt Entwicklungsvorgänge Phytohormonhaushalt	Photosynthese Transpiration Stomataverhalten Nährstoffaufnahme
Einzelpflanze	Entwicklungsvorgänge Biomassebildung und -verteilung	Wachstum Reproduktion Reservestoffbildung
Pflanzengemeinschaft	Populationsbiologische Prozesse Konkurrenzfähigkeit	Artenvielfalt Mortalität Reproduktion
Ökosystem	Biogeochemische Prozesse Produktivität	Element-, Wasser-, Energiebilanzen Artenvielfalt

Die pflanzliche Reaktion auf atmosphärische Spurengasbelastungen ist nicht nur von der Expositionskonzentration und -dauer, sondern auch von einer Vielzahl weiterer Faktoren wie den klimatischen Bedingungen (Licht, Temperatur, Luftfeuchte), der Nährstoff- und Wasserver-

sorgung, dem Entwicklungsstand der Pflanze sowie eventuellem Parasitenbefall abhängig (Mansfield et al. 1993, Davison & Barnes 1993, Heath 1994, Elstner & Hippeli 1995, Lyons & Barnes 1998). Unverkennbar ist aber auch, daß es erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität von verschiedenen Pflanzenarten gegenüber Spurengaseinwirkungen gibt (Iqbal et al. 1996, Barnes et al. 1999).

Es wird davon ausgegangen, daß insbesondere durch morphologische und physiologische Eigenschaften der Pflanzen die Aufnahmemenge und die Metabolisierung von Spurengasen bestimmt werden können. Daher ist zu erwarten, daß Pflanzen, die sich in diesen Eigenschaften grundsätzlich unterscheiden (wie z.B. C_3- und C_4-Species), auch in ihrer Toleranz gegenüber Schadgasen deutlich voneinander abweichen.

Aufgrund der gegenwärtigen Belastungssituation (siehe 1.1.) sind die Wirkungen, welche von erhöhten Ozon- und NO_x-Konzentrationen auf die Vegetation ausgehen, in den Mittelpunkt des Interesses gerückt.

Ozon wird dabei als das Schadgas mit der weitesten räumlichen Verbreitung und dem größten phytotoxischen Potential betrachtet (Bergmann et al. 1995, Heath & Taylor 1997, Barnes & Wellburn 1998).

Neben der kontinuierlich steigenden troposphärischen Hintergrundkonzentration von 1-2% pro Jahr (Stockwell et al. 1997) treten insbesondere während der Sommermonate Spitzenkonzentrationen (Sommersmog) auf, die zeitlich mit der intensivsten Wachstumsphase von Wild- und Kulturpflanzen zusammenfallen und die Entwicklung der Pflanzen beeinträchtigen können (Bender & Weigel 1995).

Ozon kann sowohl auf direktem Wege das Pflanzenwachstum beeinflussen als auch indirekt durch Veränderung der pflanzlichen Reaktion auf abiotische und biotische Stressoren Beeinträchtigungen hervorrufen (Foot et al. 1996).

Nach kurzzeitiger Exposition mit hohen Ozonkonzentrationen können akute Schädigungen wie sichtbare Blattnekrosen auftreten. Chronische Einwirkung niedrigerer O_3-Konzentrationen hingegen kann Blattverfärbungen (Chlorosen), Wachstumsminderungen und verfrühte Seneszenzerscheinungen (Pell & Dann 1991, Mulholland et al. 1997, Pell et al. 1999, Bäck et al. 1999) sowie Ertragsverluste bei Kulturpflanzen (Heagle 1989, Skärby et al. 1993, Finnan et al. 1996, Ojanperä et al. 1998, Gimeno et al. 1999) hervorrufen.

Diesen mehr oder weniger sichtbaren Schadsymptomen gehen Veränderungen auf physiologisch-biochemischer Ebene voraus, wobei allerdings noch immer offene Fragen bezüglich der biochemischen Grundlage der Ozontoxizität existieren (Mudd 1996).

Die Ozonaufnahme erfolgt durch die Spaltöffnungen der Pflanze, da die Kutikula nahezu impermeabel für O_3 ist (Lendzian & Kerstiens 1991, Wieser & Havranek 1993). Es wird davon ausgegangen, daß O_3 im Blatt sehr rasch mit Bestandteilen der Gasphase (biogene ungesättigte Kohlenwasserstoffe) und mit apoplastischem Zellwandwasser unter Bildung von freien Radikalen sowie reaktiven Sauerstoffspecies (ROS) reagiert (Hewitt et al. 1990, Kanofsky & Sima 1995, Heath & Taylor 1997).
Charakteristische chemische Reaktionen des Ozons bzw. der reaktiven Sauerstoffspezies sind die Spaltung olefinischer Doppelbindungen und die Reaktion mit Thiolen (Elstner & Hippeli 1995). Wenn die ROS nicht durch endogene Schutzsysteme der Pflanze detoxifiziert werden können, werden folglich ungesättigte Fettsäuren der Zellmembran und exponierte SH-Gruppen freier bzw. membrangebundener Proteine angegriffen, wodurch die Permeabilitätseigenschaften der Membranen verändert und Enzymaktivitäten beeinflußt werden können. Als Produkte dieser Reaktionen entstehen wiederum freie Radikale und aktive Sauerstoffspezies, die weitere Oxidationsreaktionen mit Biomolekülen in der Zelle eingehen (Pell et al. 1997).
In Abhängigkeit von der Intensität der O_3-Einwirkung und der individuellen Sensitivität der Pflanzen kann ein unregulierter Zelltod infolge irreversibler Schädigung der Plasmamembran (Verlust der Semipermeabilität) erfolgen oder eine regulierte Zellantwort mittels veränderter Genexpression stattfinden (Heath & Taylor 1997, Pell et al. 1997).

Chronische Ozoneinwirkungen können die Expression von Photosynthesegenen (kleine Untereinheit der Rubisco, Chlorophyll a/b, verschiedene Enzyme) hemmen (Glick et al. 1995, Reddy et al. 1993). Die Gene, welche die für Ethylenproduktion erforderlichen Enzyme kodieren, werden dagegen verstärkt exprimiert.
Als Folge dieser Veränderungen sinken die Konzentrationen des Chlorophylls und der CO_2-fixierenden Rubisco und die Photosyntheseleistung wird vermindert (Pell et al. 1994, Ojanperä et al. 1998). Blattverfärbungen und Chlorosen sowie vorzeitige Seneszenz treten auf.

Unter Ozoneinfluß werden allerdings auch Abwehr- und Reparatursysteme induziert, welche als „Radikalfänger" fungieren und Schädigungen durch oxidativen Streß vermeiden bzw. begrenzen können (Kangasjärvi et al. 1994, Wieser et al. 1998). Zu diesen Antioxidantien zählen Metabolite wie Ascorbat, Glutathion, α-Tocopherol, Polyamine sowie verschiedene Enzyme (Superoxid-Dismutase, Katalase, Ascorbat-Peroxidase, Glutathion-Reduktase) (Rao et al. 1996, Polidoros & Scandalios 1999).

Die Effektivität dieser endogenen Schutzsysteme stellt einen entscheidenden Faktor für die individuelle Toleranz einer Pflanze gegenüber oxidativem Streß dar.

Der gesteigerte Energiebedarf für diese Schutz- und Reparaturmechanismen führt zu einer erhöhten Dunkelatmungsrate (Darrall et al. 1989). Vielfach wurde auch von einer Veränderung der Assimilatverteilung berichtet, wodurch insbesondere das Wurzelwachstum gehemmt wird (Foot et al. 1996, Paludan-Müller et al. 1999).
Sandermann et al. (1998) interpretieren Ozon als einen Elicitor der pflanzlichen Pathogenabwehr.

Stickoxide können als trockene oder nasse Deposition in die Biosphäre gelangen und das pflanzliche Wachstum nach Aufnahme über Blätter oder Wurzeln beeinflussen. Unter mitteleuropäischen Klimabedingungen überwiegt die trockene Deposition von NO_2 (Lindberg et al. 1990); das Gas wird über die Stomata der Blätter aufgenommen und reagiert mit dem apoplastischen Zellwandwasser unter Bildung von Nitrat- und Nitritionen, welche in den regulären Stickstoffkreislauf der Pflanze eingeschleust werden (Wellburn 1990, Bambauer et al. 1994). Nitrat wird dabei durch die Nitratreduktase zu Nitrit reduziert; die Nitritreduktase katalysiert die Reaktion von Nitrit zu Ammonium, das nachfolgend in Aminosäuren eingebaut wird.
Die Aufnahme von NO hingegen ist aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit von untergeordneter Bedeutung (Van der Eerden et al. 1998).

Stickstoffdioxid kann folglich als zusätzliche N-Quelle für Pflanzen dienen. Während der Dünger-Effekt des NO_2 für landwirtschaftliche Kulturpflanzen gering ausfallen dürfte (WHO 1997), können stickstoffarme Ökosysteme in signifikanter Weise beeinflußt werden (Duyzer & Fowler 1994). Als mögliche Folgen der N-Einträge sind Eutrophierung (Bobbink 1991, Bobbink et al. 1998) und der Verlust der Artenvielfalt in sensitiven Ökosystemen (Wellburn 1990, Rosén et al. 1992) zu nennen.
Es wäre allerdings stark vereinfachend und irreführend, NO_2 lediglich als weitere N-Quelle zu betrachten.
Während kurzzeitige Expositionen mit niedrigen NO_x-Konzentrationen auf viele Arten wachstumsstimulierend wirken, können längerfristige bzw. höher konzentrierte NO_x-Expositionen Wachstumsreduktionen hervorrufen. Sehr selten treten auch sichtbare Schädigungen wie Nekrosen oder Wasserflecken auf (Wellburn 1990, Elstner & Hippeli 1995).

Die Gründe für diese phytotoxischen Effekte sind komplex und noch nicht vollständig geklärt. Die Effekte der NO_x-Exposition werden als die Wirkung erhöhter zellulärer Nitritkonzentrationen interpretiert, da Nitrit als stark phytotoxisch gilt (Wellburn 1990). Es wird diskutiert, ob diese Toxizität auf der hohen Reaktivität des NO_2^- oder auf seiner Säurewirkung beruht. Da bei der Reaktion von NO_2 mit Wasser neben Nitrat- und Nitritionen auch Protonen entstehen, muß die zelluläre pH-Kontrolle als stark gefährdet angesehen werden, wodurch wichtige physiologische Prozesse wie die Photosynthese beeinträchtigt werden können (Fuhrer 1996).
Aber auch vom NO_2-Molekül geht ein Gefährdungspotential aus, da es sich um ein Radikal handelt, das in ähnlicher Weise wie O_3 olefinische Bindungen angreifen kann. Es wird daher angenommen, daß auch NO_2 die Funktionsfähigkeit von Biomembranen empfindlich stören kann (Elstner & Hippeli 1995).
Unabhängig von diesen Mechanismen besteht die Gefahr erheblicher Nährstoffungleichgewichte in der Pflanze, da die stomatäre N-Absorption im Unterschied zur Stickstoffaufnahme über die Wurzeln nicht von einer Kationenaufnahme begleitet wird (Heber et al. 1995, Slovik 1996).

Bei der Einschätzung des phytotoxischen Potentials des NO_x ist auch die nasse Deposition in Betracht zu ziehen, die zu einer Azidifizierung des Bodens führt (Wilson & Skeffington 1994).
Da NO_x darüberhinaus als Vorläufersubstanz für die Bildung von Photooxidantien fungiert (Poppe 1993, Fowler et al. 1998), beeinflußt es das Pflanzenwachstum auch auf indirektem Wege. Hierin wird das bedeutendste phytotoxische Potential von NO_x-Emissionen gesehen (Heber et al. 1995, WHO 1997).

1.3. C_3- und C_4-Typ der Photosynthese

Höhere Pflanzen lassen sich bezüglich ihres Mechanismus der photosynthetischen Kohlenstoffassimilation in drei Gruppen einteilen: C_3-, C_4- und CAM-Pflanzen (Crassulacean-Acid-Metabolismus) (Gregory 1989, Nobel 1991, Nelson & Langdale 1992).
Pflanzenarten, die über den Calvin-Cyclus die 3-Kohlenstoffverbindung 3-Phosphoglycerat als primäres Fixierungsprodukt bilden, werden als C_3-Pflanzen bezeichnet. In C_4-Pflanzen wird Kohlenstoff primär in C_4-Säuren fixiert und anschließend durch den Calvin-Cyclus metabolisiert. Der dritte Typ der Photoassimilation (Crassulacean-Acid-Metabolismus) ist durch einen diurnalen Rhythmus im Stoffwechsel von Dicarbonsäuren gekennzeichnet.

Der größte Teil der 300 000 Arten des Festlandes zählt zum C_3-Typ der Photosynthese, während der C_4-Typ insbesondere bei Pflanzen aus Verbreitungsgebieten mit hohen Lichtintensitäten (Tropen, Subtropen) zu finden ist (Ehleringer et al. 1997, Collatz et al. 1998). Es sind auch C_3-C_4-intermediäre Pflanzen bekannt. Der Crassulacean-Acid-Metabolismus kommt vorwiegend in sukkulenten und semisukkulenten Pflanzen vor.

C_3- und C_4-Pflanzen weisen bedeutende Unterschiede in ihren anatomischen, physiologischen und biochemischen Eigenschaften auf, die in der Tabelle 1.2 dargestellt sind.
Demnach zeichnen sich C_4-Species durch eine vergleichsweise hohe apparente Photosyntheserate, hohe Wassernutzungseffizienz sowie kaum meßbare Photorespiration aus. C_3-Pflanzen hingegen assimilieren CO_2 weit weniger effektiv und weisen hohe photorespiratorische Verluste auf (Oliver et al. 1990).
Dieser Nachteil des C_3-Weges der Photosynthese erklärt sich aus der geringen Substrataffinität der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) für CO_2: Unter atmosphärischen Bedingungen arbeitet dieses Enzym unterhalb seiner maximalen Geschwindigkeit, da der Luftsauerstoff den apparenten K_m-Wert für Kohlendioxid durch kompetitive Inhibierung erhöht. Die hohe atmosphärische Sauerstoffkonzentration fördert zudem die Oxygenaseaktivität der Rubisco, die den einleitenden Schritt der Photorespiration darstellt. Dies ist in besonderem Maße bei hohen Temperaturen der Fall, da unter diesen Bedingungen die Oxygenaseaktivität der Rubisco stärker ansteigt als die Carboxylaseaktivität.

Tab. 1.2 Die wichtigsten biochemischen, physiologischen und strukturellen Unterschiede zwischen C_3- und C_4-Pflanzen (nach Mohr und Schopfer 1992, Kleber und Schlee 1992, Oaks 1994a)

Merkmal	**C_3-Pflanzen**	**C_4-Pflanzen**
Blattanatomie	Schichtentyp	Kranztyp
erstes CO_2-Fixierungsprodukt	C_3-Säure (Phosphoglycerat)	C_4-Dicarbonsäure (Oxalacetat, Malat, Aspartat)
Carboxylierende Enzyme	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco)	Mesophyll: Phosphoenolpyruvatcarboxylase Gefäßbündelscheide (sekundär): Rubisco
Apparente Photosynthese (mg CO_2 dm^{-2} Blattfläche h^{-1})	15 - 40	60 - 100
CO_2-Kompensationspunkt	hoch, temperaturabhängig	niedrig, temperaturunabhängig
Lichtsättigung der apparenten Photosynthese	niedrig (max. 200 W m^{-2})	hoch (400-600 W m^{-2})
Photorespiration	bis 30% der Bruttophotosynthese	nicht nachweisbar
Temperaturoptimum	10 - 25°C	30 - 45°C
Transpirationskoeffizient	450 - 950 g H_2O g^{-1} TM	250 -350 g H_2O g^{-1} TM
$^{13}C/^{12}C$-Verhältnis des Assimilates	-23 bis -32‰	-9 bis -16‰
Lokalisierung N-Metabolismus	Nitratreduktion und Photorespiration laufen in den Mesophyllzellen ab	Mesophyllzellen: Nitratreduktion GS (1 und 2), GOGAT, NR, NiR, NADP-GDH Bündelscheidenzellen: Photorespiration GS (1 und 2), GOGAT, NAD(P)-GDH

C_4-Pflanzen überwinden die Probleme des geringen CO_2-Partialdrucks und der Photorespiration durch eine räumlich getrennte zweistufige Carboxylierung, die als „CO_2-Pumpe" eine drastische Erhöhung der CO_2-Konzentration am Ort des Calvin-Cyclus bewirkt (Hatch 1987, Kanai & Edwards 1999).

Infolgedessen wird die Carboxylasereaktion der Rubisco gegenüber der konkurrierenden Oxygenasereaktion beschleunigt und die Photorespiration minimiert (Leegood et al. 1995, Dai et al. 1996).
Vorraussetzung für diesen CO_2-Konzentrierungseffekt ist die spezielle Blattanatomie (Kranzanatomie) der C_4-Pflanzen (Brown 1975, Nelson und Langdale 1992), die die Kompartimentierung von verschiedenen Schlüsselenzymen des Kohlenstoff-Metabolismus erlaubt: In konzentrischer Anordnung um die Leitbündel findet man eine innere Gefäßbündelscheide und einen äußeren Kranz von Mesophyllzellen, die an den interzellularen Gasraum der Blätter angrenzen.

Die in den Mesophyllzellen der C_4-Pflanzen lokalisierte Phosphoenolpyruvatcarboxylase, welche eine außerordentlich hohe Substrataffinität für CO_2 aufweist, setzt HCO_3^- mit Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat um. Dieses wird nach seiner Umwandlung zu Malat bzw. Aspartat in die Chloroplasten der Bündelscheidenzellen transportiert, in welchen die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) sowie die anderen Enzyme des Calvin-Cyclus zu finden sind (Kluge 1999).

Die Gaswechselrate zwischen Pflanze und Umgebung wird maßgeblich vom stomatären Diffusionswiderstand, d. h. von der Öffnungsweite der Stomata, bestimmt (Ziegler 1995).
Aufgrund ihres effektiven CO_2-Einbaus können C_4-Pflanzen auch bei vergleichsweise geringer Öffnungsweite der Stomata ausreichend Kohlendioxid aus der Atmosphäre aufnehmen. Infolgedessen sind sowohl die Transpiration als auch die Aufnahme phytotoxischer Spurengase im Vergleich zu C_3-Pflanzen deutlich vermindert, wodurch C_4-Arten eine größere Wassernutzungseffizienz (Collatz et al. 1992) und möglicherweise auch eine höhere Schadgasresistenz aufweisen.

Da das Vorkommen der Rubisco, welche das Hauptprotein der Blätter darstellt (Stitt 1991), in C_4-Pflanzen auf die Bündelscheidenzellen beschränkt ist, müssen diese Arten weniger Stickstoff in den Photosyntheseapparat investieren als C_3-Pflanzen (Slack und Hatch 1967, Huber

et al. 1976, Conroy 1992). Daher erreichen C_4-Species ihre (vergleichsweise oft höheren) maximalen relativen Wachstumsraten bei niedrigeren Stickstoffkonzentrationen im Blatt als C_3-Pflanzen (Greenwood 1976, Brown & Wilson 1983). Es wurde nachgewiesen, daß C_4-Gräser auf Stickstoffdüngung stärker mit Biomasseproduktion (Trockenmasse pro applizierter N-Einheit) reagieren als C_3-Pflanzen (Sage und Pearcy 1987, Kumar et al. 1993).

Diese Befunde belegen die höhere Effizienz der Stickstoffverwertung (nitrogen use efficiency, NUE) bei C_4-Pflanzen, welche bereits 1978 von Brown als ein weiterer charakteristischer Unterschied zwischen C_3- und C_4-Pflanzen beschrieben wurde. Die NUE wurde von Brown als Biomasseproduktion bzw. fixierte CO_2-Menge bezogen auf den Stickstoffgehalt der Pflanze definiert.

Die Arbeiten von Oaks (1994a) deuten darauf hin, daß in C_3-Pflanzen die NO_3^--Assimilation durch Produkte der Photorespiration (Ammonium) gehemmt werden kann. In C_4-Pflanzen hingegen findet eine solche Inhibierung aufgrund der geringen Photorespirationsrate und der räumlichen Trennung von Nitratassimilation und Photorespiration nicht statt; der Einbau anorganischen Stickstoffs in Aminosäuren kann daher effektiver erfolgen als in C_3-Pflanzen.

Die Hypothese, daß Vertreter dieser beiden Photosynthesetypen in ihrer Reaktion auf Luftschadstoffe differieren, gründet sich insbesondere auf folgende Überlegungen:

- Das unterschiedliche Stomataverhalten läßt erwarten, daß C_3-Arten deutlich mehr atmosphärische Schadstoffe aufnehmen als C_4-Pflanzen.
- Die Unterschiede im Blattaufbau und in der Kompartimentierung verschiedener Enzyme können von entscheidender Bedeutung für die Sensitivität gegenüber Schadgasen sein.
- Die höhere Photorespirationsrate der C_3-Pflanzen birgt die Gefahr hoher zellulärer Ammoniumkonzentrationen in sich. Hohe N-Einträge könnten die Entgiftungskapazität der Pflanze überfordern.
- Insbesondere für die Ammoniumdetoxifizierung ist die ausreichende Bereitstellung von C-Skeletten erforderlich (Tapia et al. 1996). Aufgrund der höheren Photosyntheserate könnten C_4-Pflanzen hier im Vorteil sein.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

2.1.1. Pflanzenanzucht und N-Düngungsexperimente

Für die vergleichenden Untersuchungen von Pflanzen, die unterschiedlichen Photosynthesetypen angehören, wurden die Arten *Triticum aestivum* (C_3-Typ) und *Zea mays* (C_4-Typ) ausgewählt.

Das Saatgut wurde von der Lochow-Petkus GmbH Bergen (*Triticum aestivum* var. "Nandu") bzw. von der Saatzucht GmbH & Co. KG, Zuchtstation Biendorf (*Zea mays* A x B) bezogen.

Als Bodensubstrat diente Vermiculite.

Als Nährlösung wurde eine modifizierte Hoagland-Lösung (Hoagland & Arnon 1950) verwendet, deren pH-Wert mit KOH auf 6,0 eingestellt wurde (Tab. 2.1).

Tab. 2.1 Zusammensetzung der Nährlösung für die Pflanzenanzucht (N-frei, pH 6,0)

Nährstoff	**Konzentration**
$CaCl_2$	2,8 mM
KH_2PO_4	4,3 mM
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	1,0 mM
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	18,0 µM
Na_2-EDTA	16,1 µM
H_3BO_3	46,2 µM
$MnCl_2$	14,3 µM
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,3 µM
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	0,5 µM
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	0,7 µM

Für die **unmarkierte Anzucht** von *Triticum aestivum* und *Zea mays* wurden Kunststoffbehälter (30 x 15 x 15 cm) mit je 600 g Vermiculite (1 - 2 mm Korngröße) gefüllt und mit N-freier Nährlösung (2 l) gesättigt. Nach vorheriger Oberflächensterilisierung mit Natriumhypochloritlösung (10 min) wurden je 60 Weizen- bzw. 30 Maiskörner pro Anzuchtgefäß ausgelegt.

Am 6., 9. und 13. Tag nach der Aussaat erfolgte eine N-Düngung in Form von Kaliumnitrat- bzw. Ammoniumchloridlösung. Die Pflanzen erhielten Stickstoffgaben von insgesamt 0 - 200 kg N/ha. Der Gewichtsverlust durch Verdunstung wurde täglich mit bidestilliertem Wasser ausgeglichen.

Für die **Anzucht ^{15}N-markierter Pflanzen** wurden Glasschalen (Durchmesser 14 cm) verwendet, die mit 100 g Vermiculite und 350 ml N-freier Nährlösung gefüllt wurden. Die Stickstoffversorgung der Pflanzen erfolgte analog der unmarkierten Anzucht; $(^{15}NH_4)_2SO_4$ (5 Atom% ^{15}N), $K^{15}NO_3$ (5 Atom% ^{15}N) bzw. $NH_4{}^{15}NO_3$ (10 Atom% ^{15}N im Nitrat-N) wurden in gelöster Form gegeben. Es wurden jeweils 8 Mais- bzw. 17 Weizenpflanzen pro Gefäß angezogen.

Die Anzucht fand in einer Klimakammer (Heraphyt 1500, Fa. Heraeus-Voetsch) unter folgenden Bedingungen statt: Lichtphase 6 - 20 Uhr, 23°C, 65 % relative Luftfeuchte; Dunkelphase 20 - 6 Uhr, 16°C, 85 % relative Luftfeuchte. Die Lichtintensität der Beleuchtung betrug maximal 60000 Lux in 500 mm Lichtpunkthöhe und wurde von Metallhalogenidstrahlern mit tageslichtähnlichem Spektrum (Typ Osram, HQF-250 W/NDL, Sekurit) erzeugt.

Nach 15 Tagen wurden die Pflanzen geerntet und nach Sproß und Wurzeln getrennt bei -70 °C eingefroren. Die Maispflanzen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Vierblatt-, die Weizenpflanzen im Dreiblattstadium.

2.1.2. $^{15}NO_2$-Exposition

Die $^{15}NO_2$-Exposition fand in den Expositionskammern des Institutes für Radioagronomie der KFA Jülich statt.

Die Pflanzen wurden analog dem unter 2.1.1. beschriebenen Bedingungen in Glasschalen auf Vermiculite angezogen. Zur N-Versorgung wurde **unmarkiertes KNO_3** gegeben (50 bzw. 200 kg N/ha).

Im Alter von 14 Tagen wurden die Pflanzen in die Expositionskammer gebracht und nach einer Akklimatisierungsphase von 24 h mit 25 ppb (Kammer 1) bzw. 50 ppb $^{15}NO_2$ (Kammer 2) während der Lichtphase begast. Die ^{15}N-Konzentration des Expositionsgases betrug 10,25 Atom%.

Nach Beendigung der achtstündigen Exposition wurde ein Teil der Pflanzen sofort geerntet, in Blätter, Sproßachse und Wurzeln getrennt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Ernte der übrigen Pflanzen erfolgte 24 h später.

Aufbau der Expositionskammern

Die Expositionskammern wurden von der Firma Schott Engineering GmbH konstruiert.

Da Wechselwirkungen zwischen der Oberfläche der Kammer und den in der Kammer befindlichen Gasen vermieden werden müssen, wurden inerte Materialien, Borosilicatglas für die Herstellung der Gefäße und Teflon bzw. Glas für die Schläuche und Dichtungen, verwendet.

Die Kammerm bestanden aus je einem Glaskolonnenrohr, dessen oberer Teil durch eine Glashaube abgeschlossen wurde, während der sich unten anschließende Wurzelraum mittels einer Teflonplatte abgedichtet wurde. Das Kolonnenrohr war mit mehreren Stutzen versehen, die den Anschluß der Luftzu- und -abführungen sowie das Einführen von Meßfühlern ermöglichten.

In der Teflonplatte befanden sich Bohrungen, die dem Einbringen und Befestigen der Pflanzen dienten.

Das Innenraumvolumen der Kammer 1 betrug 1055 l, während die Kammer 2 ein Volumen von 164 l aufwies. Je ein Ventilator sorgte für die Durchmischung der Luft in den Kammern.

Um kontrollierte Versuchsbedingungen zu schaffen, sind die Expositionskammern in jeweils einer Klimakammer (Fa. Hühren) untergebracht.

Die installierten Flow-Controller wurden von einer Flußregelungsanlage gesteuert (Kammer 1: WMR 4-24, Westphal Meß- und Regeltechnik, Kammer 2: MKS Instruments).

Die Bestimmung der Stickoxidkonzentrationen erfolgte mit Hilfe der Chemolumineszenzmethode. Da der Chemolumineszenzdetektor (Kammer 1: CLD 770 AL, Kammer 2: CLD 502 Tecan) ausschließlich NO nachweisen kann, wurde NO_2 mittels eines Photolysekonverters (PLC 760) in Stickstoffmonoxid umgewandelt. Zusätzlich wurde die Ozonkonzentration mit einem photometrischen O_3-Analysator (Thermo Environmental TE49 bzw. Dasibi 1008-RS) bestimmt.

2.1.3. Ozonexposition

Für die Ozonexposition in den open top-Kammern der FAL Braunschweig wurde ein modifiziertes Anzuchtregime verwendet, um die Vergleichbarkeit mit Versuchen, die bereits im Vorjahr unter den hier gewählten Bedingungen durchgeführt wurden, zu gewährleisten.

Das Samenmaterial wurde vorgequollen und auf feuchtem Zellstoff vorgekeimt. Für die enzymatischen Bestimmungen (**unmarkierte Anzucht**) wurden die Keimlinge in Plastikbehälter (30 x 15 x 15 cm) gepflanzt, welche mit 1,5 kg Boden-Sand-Gemisch (2/3 Boden, 1/3 Sand)

gefüllt waren. Der Stickstoffgehalt des getrockneten, gesiebten Bodens wurde mit Hilfe der Kjeldahlmethode ermittelt und betrug 0,15%.
Pro Gefäß wurden 60 Weizen- bzw. 30 Maiskeimlinge eingesetzt. Der Boden wurde mit bidestilliertem Wasser befeuchtet.

Für die **Anzucht ^{15}N-markierter Pflanzen** wurden Glasschalen (Durchmesser 14 cm) verwendet, die mit Boden und Quarzsand gefüllt waren. Pro Gefäß wurden 20 mg Stickstoff entweder als $(^{15}NH_4)_2SO_4$ (11,2 Atom% ^{15}N) oder als $K^{15}NO_3$ (10,2 Atom% ^{15}N) in gelöster Form gegeben. Es wurden jeweils 8 Mais- bzw. 10 Weizenpflanzen pro Gefäß angezogen.

Die Ozonexposition der Pflanzen wurde in den open top-Kammern des Institutes für Produktions- und Ökotoxikologie der FAL Braunschweig durchgeführt. Die Pflanzen wurden 7 Tage unter Gewächshausbedingungen angezogen, bevor sie für 14 Tage in den open top-Kammern begast wurden (2.-16. Juni 1994).
Die open top-Kammern bestanden aus einem Aluminiumrahmen, der mit Polyethylenfolie bespannt war (Durchmesser ca. 3,2 m, Höhe ca. 3,4 m, Grundfläche ca. 7,8 m^2, Volumen ca. 26 m^3). Eine detaillierte Beschreibung der Kammern mit den dazugehörigen Filter-, Dosier- und Meßvorrichtungen sowie dem Datenerfassungssystem ist bei Weigel & Jäger (1988) zu finden.
O_3 wurde täglich für 10 h (10.00 - 20.00 Uhr) zur gefilterten Luft dosiert. Die Dosierung wurde so gewählt, daß in einem Zeitraum von 8 h (11.00 - 19.00 Uhr) ein Sollwert von 90 ppb erreicht werden sollte, falls die O_3-Konzentration in der Außenluft 40 ppb überschreitet.
War die Außenluftkonzentration geringer als 40 ppb, wurde mit einer O_3-Konzentration von ca. 60 ppb begast. Zwischen 10.00 und 11.00 Uhr sowie 19.00 und 20.00 Uhr wurde die Ozonkonzentration generell auf 45 ppb beschränkt. Während des Expositionsversuches betrug die durchschnittliche Zudosierung 72 ppb Ozon (täglich 11. 00-19. 00 Uhr).
Als Kontrolle diente mit Aktivkohle gefilterte Luft ohne O_3-Zusatz.
Während der gesamten Anzuchtphase wurde der Wasserverlust der Pflanzen täglich ausgeglichen.
Nach 14tägiger Begasung wurde das Pflanzenmaterial geerntet, indem die oberirdischen Pflanzenteile mit einer Keramikschere abgeschnitten und sofort eingefroren wurden. Bis zur Aufarbeitung wurden die Pflanzen bei -70 °C aufbewahrt.

2.2. Enzymatische Bestimmungen

Es wurden die *in vitro* Aktivitäten von Schlüsselenzymen des pflanzlichen Stickstoffmetabolismus bestimmt, welche die folgenden Reaktionen katalysieren:

1. NADH-Nitratreduktase (EC 1.6.6.1)

$$NO_3^- + 2\ NADH \longrightarrow NO_2^- + H_2O + 2\ NAD^+$$

2. Nitritreduktase (EC 1.7.7.1)

$$NO_2^- + 8\ H^+ + 6\ Ferredoxin_{red} \longrightarrow NH_4^+ + 2\ H_2O + 6\ Ferredoxin_{ox}$$

3. Glutaminsynthetase (EC 6.3.1.2)

$$L\text{-Glutamat} + NH_4^+ + ATP \longrightarrow L\text{-Glutamin} + ADP + P_i$$

4. NADH-Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.2)

$$2\text{-Oxoglutarat} + NH_4^+ + NADH \longleftrightarrow L\text{-Glutamat} + NAD^+ + H_2O$$

2.2.1. Gewinnung des Rohenzymextraktes für enzymatische Bestimmungen

250 mg tiefgefrorenes Frischmaterial wurde in flüssigem Stickstoff zerrieben und in 4 ml des entsprechenden Aufschlußpuffer aufgenommen. Es erfolgte eine Homogenisierung mit dem Ultraturrax (60 s, 13500 U/min). Nach Zentrifugation des Homogenats bei 14000g für 30 min bei 4 °C und anschließender Filtration wurde der Überstand als Rohenzymextrakt verwendet.
Die Aufschlußpuffer waren folgendermaßen zusammengesetzt:
A) für NR- und NiR-Bestimmung: 0,1 M KH_2PO_4, pH 7,5; 1 mM Na_2-EDTA, 0,5% (w/v) Rinderserumalbumin; 1% (w/v) unlösliches Polyvinylpyrrolidon; 0,1% (w/v) Triton X-100; 10 mM Cystein-HCl; 5 mM Dithioerythritol; 20 µM FAD.
B) für GS- und GDH-Bestimmung: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5; 0,5 mM $MgSO_4$; 0,5 mM Na_2-EDTA; 2% (w/v) unlösliches Polyvinylpyrrolidon; 0,4 % (w/v) Triton X-100; 1 mM Cystein-HCl; 10 mM Dithioerythritol.
Cystein -HCl, Polyvinylpyrrolidon und FAD wurden stets frisch zugesetzt.

2.2.2. Bestimmung der NADH-Nitratreduktase-Aktivität (NADH-NR)

Die Bestimmung der NR-Aktivität erfolgte über die photometrische Messung der Menge des gebildeten Nitrits. Der Testmix enthielt in einem Volumen von 1 ml 34 mM KH_2PO_4, pH 7,5; 25 mM KNO_3; 20 µM FAD; 250 µM NADH und maximal 300 µl Rohenzymextrakt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des NADH gestartet und nach 20 min Inkubation bei 30 °C mit 100 µl 1 M Zinkazetat-Lösung abgestoppt. Als Kontrolle diente ein Versuchsansatz, der kein NADH enthielt.

Der Versuchsansatz wurde 10 min zentrifugiert. Für den Nitritnachweis wurden 550 µl des Überstandes mit 50 µl 0,18 mM Phenazinmethosulfat versetzt und 30 min im Dunkeln inkubiert, um das überschüssige NADH, welches die Farbreaktion stören würde, zu oxidieren. Anschließend erfolgte der Nitritnachweis durch Zugabe von 0,25 ml 1% (w/v) Sulfanilamid in 1,5 N HCl und 0,25 ml 0.02% (w/v) N(1-Naphthyl)ethylendiamindihydrochlorid. Die Extinktion des entstandenen Azofarbstoffs wurde nach 15 min bei 540 nm photometrisch gemessen und die Menge des gebildeten Nitrits aus einer Eichkurve ermittelt.

2.2.3. Bestimmung der Nitritreduktase-Aktivität (NiR)

Der Testansatz enthielt in 1 ml 64 mM KH_2PO_4, pH 7,5; 0,6 mM KNO_2; 2,9 mM Methylviologen, 50 µl $Na_2S_2O_4$ (50 mg/ml 0,29 M $NaHCO_3$) und maximal 200 µl Rohenzymextrakt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des frisch zubereiteten Natriumdithionits gestartet, die Inkubation erfolgte bei 30 °C. Nach 15 min wurden 50 µl des Reaktionsansatzes mit Bidest auf 1 ml aufgefüllt und 10 sec kräftig geschüttelt, wodurch das Methylviologen vollständig oxidiert und die Reaktion abgestoppt wurde. Nach Zugabe von je 0,25 ml der Reagenzien für die Nitritfärbung (siehe Nitratreduktase-Test) erfolgte die photometrische Messung der Extinktion bei 540 nm. Die Nitritreduktaseaktivität ergab sich aus der Abnahme der Nitritkonzentration im Vergleich zur Nullzeitkontrolle.

2.2.4. Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivität (GS)

Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe des halbsynthetischen Synthetase-Tests, bei dem das Ammonium durch Hydroxylamin ersetzt wird. Hydroxylamin besitzt die gleiche Affinität zur Glutaminsynthetase wie Ammonium und verändert auch die Affinitäten zu anderen Substraten nicht (Miflin & Lea 1977). Als Reaktionsprodukt entsteht γ-Glutamylhydroxamat.
Der Testansatz enthielt in 1 ml 300 µl 0,4 M Imidazol-HCl, pH 7,2; 0,15 M Glutamat; 10 mM NH_2OH; 15 mM ATP; 50 mM $MgSO_4$; 10 mM EDTA-Na_2 und maximal 200 µl Rohenzymextrakt. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe des Enzymextraktes. Nach 20 min Inkubation bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,75 ml Stoppreagenz (0,3 M TCA, 0,57 M $FeCl_3$ in 1 M HCl) beendet. Die Reaktionsansätze wurden 10 min zentrifugiert und der Überstand bei 540 nm am Photometer gemessen. Die mittels einer Eichkurve bestimmten Konzentrationen des gebildeten γ-Glutamylhydroxamats stellten das Maß für Glutaminsynthetase-Aktivität dar.

2.2.5. Bestimmung der NADH-Glutamatdehydrogenase-Aktivität (NADH-GDH)

Die GDH wurde mittels optischen Test nach Yamaya et al. (1984) und Shargool und Jain (1989) bestimmt. Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 3 ml:
0,1 M Tris /HCL, pH 8,5; 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$; 140 µM NADH; 10 mM 2-Oxoglutarat;
7 mM $CaCl_2$ und 200 µl Rohenzymextrakt. Der Start der Enzymreaktion erfolgte durch Zugabe des 2-Oxoglutarats. Der NADH-Abfall wurde über 4 min bei 30 °C gemessen.

2.3. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des löslichen Proteins wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt. Dafür wurden 100 µl Rohenzymextrakt B mit 100 µl 20%iger Trichloressigsäure über Nacht bei 4°C gefällt. Nach 10 min Zentrifugation bei 14 000g wurde das Pellet mit 0,5%iger Trichloressigsäure gewaschen, nochmals zentrifugiert und in 1 ml 1N NaOH aufgenommen. 100 µl dieser Lösung wurden zur Proteinbestimmung eingesetzt.
Zunächst erfolgte eine 10minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 1 ml einer Lösung, die täglich frisch hergestellt wurde. Eine 1%ige $CuSO_4$-Lösung wurde im Verhältnis 1 : 1 mit einer 2%igen Na-K-Tartratlösung gemischt. Ein Volumen dieser Lösung wurde mit 49 Volumina einer 2%igen Na_2CO_3-Lösung versetzt.
Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 100 µl Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz und 2 ml bidestilliertes Wasser zugegeben. Die Extinktion wurde nach 30 min am Spektralphotometer bei 578 nm gegen einen Blindwert gemessen, der anstatt der Proteinlösung 100 µl 1N Natronlauge enthielt.
Für die Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin als Standard erstellt.

2.4. Bestimmung der Pigmentgehalte

100 mg Frischmaterial wurden mit 4 ml kaltem Aceton zermörsert, eine Stunde bei Dunkelheit zur Extraktion unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Der Überstand wurde abzentrifugiert, das Pellet noch zweimal mit je 2 ml Aceton gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt, mit Aceton auf 10 ml aufgefüllt. Die Absorptionen bei 470 nm, 646 nm,
663 nm und 750 nm wurden photometrisch bestimmt; die bei 750 nm gemessene Absorption (erfaßt Trübungen) wird von allen Absorptionen abgezogen. Die so erhaltenen Extinktionswerte E werden zur Berechnung der Pigmentgehalte herangezogen.

Chl a [µg/ml Extrakt] = 12,21 * E_{663} - 2,81 * E_{646}

Chl b [µg/ml Extrakt] = 20,13 * E_{646} - 5,03 * E_{663}

$$\text{Carotinoide [µg/ml Extrakt]} = \frac{1000 * E_{470} - 3{,}27 * \text{Chl a} - 104 * \text{Chl b}}{229}$$

2.5. Nitratbestimmung

Der Nitratgehalt wurde nach Cataldo et al. (1976) bestimmt. Dafür wurden 50 mg Pflanzenmaterial mit 1,5 ml bidestilliertem Wasser (kalt) gemörsert, anschließend 30 min bei 4°C inkubiert und 5 min bei 4°C zentrifugiert. Für den Nitrattest wurden 50 µl des erhaltenen Extraktes mit 250 µl 5%iger Salizylsäure (w/v in konzentrierter Schwefelsäure) versetzt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 4,7 ml 2N NaOH.
Die Extinktion konnte bei 410 nm am Photometer vermessen werden, sobald der Testansatz wieder auf Raumtemperatur abgekühlt war.
Als Blindwerte dienten Ansätze, denen keine Salizylsäure zugesetzt worden war.

2.6. Nitritbestimmung

Für die Nitritbestimmung nach dem unter 2.2.2. beschriebenen Prinzip wurden 0,6 ml Rohenzymextract mit je 0,25 ml der entsprechenden Färbereagenzien versetzt. Im Anschluß an eine 15minütige Inkubationszeit wurde die Extinktion bei 540 nm photometrisch bestimmt.

2.7. Ammoniumbestimmung

Zur Testung des Ammoniumgehaltes wurde die Phenol-Hypochlorit-Reaktion nach Weatherburn (1967) genutzt. 50 mg Pflanzenmaterial wurden mit 1,5 ml 0,1M HCl (kalt) gemörsert und im Anschluß an eine 30minütige Inkubation im Kühlschrank 5 min bei 14000g und 4°C zentrifugiert.
Der Testansatz enthielt 50 µl 0,1M HCl, 50 µl Extrakt, 700 µl Bidest, 100 µl Phenolreagenz (5 g Phenol, 25 mg Natriumnitroprussid in 100 ml Bidest) sowie 100 µl Hypochloritreagenz (2,5 g NaOH, 4 ml NaOCl ad 100 ml mit Bidest). Nach einer Reaktionszeit von 20 min bei 37°C wurde die Extinktion bei 625 nm gemessen.

2.8. Stickstoffanalytik

Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl (1883), modifiziert nach Faust (1981), sollte Aufschluß über die N-Gehalte in den Pflanzen geben und als Probenvorbereitung für die emissionsspektrometrische Untersuchung der ^{15}N-Häufigkeiten dienen.
Es wurden sowohl der Gesamtstickstoff in Pflanzenfraktionen von Weizen und Mais als auch die N-Gehalte in verschiedenen Stickstofffraktionen bestimmt.

2.8.1. Die Auftrennung in N-Fraktionen

Zunächst wurden 0,5-2 g Frischmaterial in 10 ml 0,1M Phosphatpuffer, pH 6,5, mittels Ultraturrax 3 min unter Eiskühlung homogenisiert und über Nacht (mindestens 18 h) im Kühlschrank bei 4°C extrahiert. Die *unlösliche Proteinfraktion* (primär Strukturprotein, SP) wurde durch Filtration abgetrennt, mit 1-2 ml Phosphatpuffer gewaschen und gemeinsam mit dem Filterblättchen (aschefreie Rundfilter 589[3] der Fa. "Schleicher & Schuell") in einen Kjeldahlkolben überführt.
Das Filtrat wurde im Verhältnis 1 : 1 mit 20%iger Trichloressigsäure versetzt und zur Fällung 16 h bei 4°C aufbewahrt. Durch 15 min Zentrifugation bei 14 000g konnte die *Nichtproteinfraktion* (NPN) vom *löslichem Protein* (LP) abgetrennt werden. Die *lösliche Proteinfraktion* wurde mit 5 ml 0,5%iger Trichloressigsäure gewaschen, nochmals zentrifugiert und mittels aqua bidest in einen Kjeldahlkolben überführt.

2.8.2. Kjeldahl-Aufschluß

Um die verschiedenen, im Pflanzenmaterial vorliegenden Stickstofformen in Ammonium umzuwandeln, wurden die Proben (ca. 20 mg Trockenmasse oder 200-500 mg Frischmasse bzw. die nach 2.8.1. gewonnenen pflanzlichen N-Fraktionen) in 100 ml-Kjeldahlkolben mit 2 ml konzentrierter Schwefelsäure (N-frei) versetzt und nach Zugabe einer Spatelspitze Selenreaktionsgemisch nach Wieninger auf einer KJELDAHL Aufschlußapparatur KI16 der Fa. Gerhardt erhitzt. Das Selenreaktionsgemisch wirkt als Katalysator und besteht aus 500 Teilen Na_2SO_4 und jeweils 8 Teilen $CuSO_4$ und Se.
Die Proben wurden gekocht, bis sie vollständig klar geworden waren. Zur Sicherheit wurden sie dann noch eine weitere Stunde erhitzt und nach dem Abkühlen mit 5-10 ml aqua bidest verdünnt.

2.8.3. Quantitative Stickstoffbestimmung durch Wasserdampfdestillation

Für die Stickstoffbestimmung wurde eine Wasserdampfdestillationsapparatur nach Faust (1981) benutzt.

Die Probe wurde zunächst mit einem Überschuß an 32%iger Natronlauge versetzt, so daß ein alkalisches Milieu entstand und der Stickstoff als Ammoniak mit Wasserdampf ausgetrieben werden konnte. Als Vorlage diente ein Kantkolben, in dem NH_4OH aufgefangen und mit 0,02N H_2SO_4 (Titrisol, Merck) titriert wurde. Zur Bestimmung des Umschlagpunktes wurde der Tashiro-Indikator (125 mg Methylrot, 80 mg Methylenblau mit absolutem Ethanol ad 100 ml) verwendet.

Da 1 ml 0,02N H_2SO_4 exakt die Menge NH_4OH neutralisiert, die 0,28 mg N enthält, kann man den Stickstoffgehalt wie folgt bestimmen:

$$\text{mg N} = \text{ml } 0{,}02\text{N } H_2SO_4 * 0{,}28$$

Die aus der Titration resultierende Ammoniumsulfatlösung wurde in Abdampfschalen auf einem Wasserbad bei 80°C eingedampft und in dieser Form für die emissionsspektrometrische Untersuchung aufbewahrt.

2.9. Bestimmung der ^{15}N-Häufigkeiten

2.9.1. Grundlagen der ^{15}N -Tracertechnik

Die Aufnahme und Metabolisierung einer Stickstoffverbindung in einer Pflanze läßt sich verfolgen, indem man den Stickstoff zuvor markiert. Die Verwendung des radioaktiven Isotopes ^{13}N ist allerdings wegen der zu kurzen Halbwertszeit nicht sinnvoll.

Eine andere Möglichkeit ergibt sich aus dem Fakt, daß der natürlich vorkommende Stickstoff aus einem Gemisch von zwei stabilen Isotopen besteht, wobei die relativen Häufigkeiten von ^{14}N 99,634 Atom% und von ^{15}N 0,366 Atom% betragen. Jede Veränderung der relativen Häufigkeit (abundance) dieser Isotope gegenüber der natürlichen Häufigkeit (Standard) stellt eine Markierung dieses Stickstoffs dar. Das Stickstoffisotop ^{15}N eignet sich aufgrund seiner geringen natürlichen Häufigkeit sehr gut für Tracerexperimente, da der natürliche Untergrund die Bestimmung kaum stört.

Die Isotope eines Elementes unterscheiden sich durch die Anzahl ihrer Neutronen, wodurch die Atommasse, das Volumen, die Symmetrie sowie die magnetischen Eigenschaften des Atomkerns beeinflußt werden. Daraus resultieren Unterschiede in den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Atome bzw. der sie enthaltenden Moleküle.

Aufgrund des geringen Massenunterschiedes der Stickstoffatome ^{14}N (Molmasse 14,003 g/mol) und ^{15}N (Molmasse 15,010 g/mol) spielen die chemischen Isotopieeffekte nur eine geringe Rolle; beim Einsatz von ^{15}N-Tracern mit ^{15}N-Häufigkeiten über 0,5 Atom% sind sie zu vernachlässigen. Daher ist gewährleistet, daß der N-Metabolismus nicht durch den Einsatz des ^{15}N als Tracer beeinflußt wird.

Die physikalischen Isotopieeffekte (z.B. Unterschiede in Absorptions- und Emissionsspektren) bilden die Grundlage für die Detektion der stabilen Isotope.

2.9.2. Emissionsspektrometrische ^{15}N -Bestimmung

Da das Emissionsspektrum des Stickstoffs gut auflösbare und vergleichsweise große Isotopieverschiebungen aufweist, stellt die Emissionsspektrometrie eine geeignete Methode für die Bestimmung der relativen Häufigkeit des stabilen Isotops ^{15}N dar.

Molekül	Wellenlänge
$^{14}N_2$	297,68 nm
$^{14}N^{15}N$	298,29 nm
$^{15}N_2$	298,86 nm

Das eingesetzte $^{15/14}N$-Emissionsspektrometer NOI 7 (Fa. FAN, Leipzig) ermöglicht Isotopenanalysen im Bereich von 0,34 bis 80 Atom% ^{15}N. Die erforderliche Probenmenge beträgt 10 µg N.

Aus wässrigen Proben (z. B. Ammoniumsulfatlösung) wird zunächst mittels des chemischen Probenumarbeitungssystems NOI 7c molekularer Stickstoff erzeugt. Die Zugabe einer definierten Menge NaOBr bewirkt die Freisetzung des Probenstickstoffs gemäß der folgenden Reaktionsgleichung:

$$2\,NH_4^+ + 3\,BrO^- + 2\,OH^- \longrightarrow N_2\uparrow + 5\,H_2O + 3\,Br^-$$

Das Probengas gelangt in einem kontinuierlichen Heliumstrom in das integrierte Gasentladungsrohr, wo es bei vermindertem Druck in einem hochfrequenten elektrischen Feld zur Lichtemission im UV-Bereich angeregt wird. Das abgestrahlte Licht der drei möglichen Kombinationen der beiden stabilen Stickstoffisotope ^{14}N und ^{15}N im Stickstoffmolekül wird nach seiner spektralen Zerlegung in einem Gitterpolychromator in ein elektrisches Signal umgewandelt und digital verarbeitet.

Für die ^{15}N-Analyse am NOI 7 wurden die eingedampften Proben in aqua bidest gelöst, so daß in dem jeweils eingesetzten Probenvolumen von 25 µl 10 µg Stickstoff enthalten waren.

Die ^{15}N-Exzeßhäufigkeit (a') wurde durch Abzug der natürlichen ^{15}N-Häufigkeit (a_0 = 0,366 Atom%) von der ^{15}N-Häufigkeit (a) ermittelt. Die ^{15}N-Exzeßmasse m(15)' wurde wie folgt berechnet:

$$m(15)' = (15 * a' * m_N) / (1400 + a)$$

m_N: Masse des Stickstoffs in der Probe

2.10. HPLC-Analyse freier Aminosäuren

Es wurden in verschiedenen Pflanzenfraktionen (Blätter, Sproßachse, Wurzeln) ausgewählter Proben die Gehalte an folgenden freien Aminosäuren bestimmt: Asparagin (Asn), Glutamin (Gln), Aspartat (Asp), Serin (Ser), Glutamat (Glu), Arginin (Arg), Glycin (Gly), Alanin (Ala) und Prolin (Pro).

2.10.1. Gewinnung der Extrakte

Das N_2-gefrorene Pflanzenmaterial wurde in einem Dismembrator (Mikrodismembrator U. B. Biotech, Melsungen) pulverisiert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für den Aufschluß wurden 0,5-0,7 g in Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 7 ml 4%iger Sulfosalicylsäure versetzt. Als interner Standard wurden 200 µl 1mM Norvalin zugegeben. Auf die Homogenisierung mit dem Ultraturrax (45 sec) folgte eine einstündige Inkubation bei 4°C. Die Proben wurden dann 10 min bei 4°C zentrifugiert (26500 g). 4 ml des Überstandes wurden in 5 ml Maßkolben pipettiert, mit 100 µl 30%iger NaOH versetzt und mit Sulfosalicylsäure (pH 3) auf 5 ml aufgefüllt. Zur Entfernung von Schwebstoffen wurden die Extrakte membranfiltriert und bis zur weiteren Analyse bei -30°C aufbewahrt.

2.10.2. Derivatisierung

Die Derivatisierung mit 9-Fluorenylmethylchloroformat (FMOC) wurde nach dem bei Einarsson et al. (1983) und Gustavsson & Betnér (1990) beschriebenen Verfahren durchgeführt.
Für die Derivatisierung wurden 50 µl Probe (entsprechend verdünnter Extrakt) mit 150 µl FMOC (2,5 mM in Aceton) und 100 µl 1M Borat-Puffer (pH 7,8, mit 30%iger NaOH eingestellt) versetzt. Nach einminütigem Schütteln war die Derivatisierung abgeschlossen. Um das überschüssige FMOC zu entfernen, wurden 200 µl 25 mM ADAM (1-Aminoadamantan) zugegeben und der Ansatz 1 min geschüttelt. Anschließend wurde auf 1500 µl mit Eluent B (siehe 2.10.3.) aufgefüllt.

Es wurden 5 Standards mitgeführt. Die entsprechenden Derivatisierungsansätze enthielten 20, 40 oder 80 µl einer 10 µM Aminosäuremischung bzw. 60 oder 80 µl einer 20 µM Aminosäurelösung.
Bis zur Injektion wurden die Standards bzw. Aminosäureproben in einem gekühlten Autosamplerrack bei 10°C aufbewahrt.

2.10.3. HPLC

Die Auftrennung und quantitative Bestimmung der FMOC-Aminosäurederivate erfolgte mittels RP-HPLC und fluorimetrischer Detektion.
Es wurden ein Flüssigkeitschromatograph (Merck, Darmstadt) mit einer L-6200 Pumpe, ein AS-4000 Autosampler mit Rackkühlung, ein Säulenofen und ein F-1080 Fluoreszenzdetektor eingesetzt.
Die Anregung erfolgte mit einer Strahlung von 265 nm, die Emission wurde bei 310 nm gemessen.

Als stationäre Phase diente Supersphere C_8-60, 4 µm (Merck, Darmstadt). Die entsprechende Säule (125 x 4 mm) wurde auf 35°C temperiert.
Die mobile Phase bestand aus Natriumacetatpuffer (100 mM, pH 4,2), Acetonitril und Tetrahydrofuran.

	Na-Acetat-Puffer	:	Acetonitril	:	Tetrahydrofuran (Volumenverhältnis)
Eluent A:	79,5	:	20	:	0,5
Eluent B:	20	:	79,5	:	0,5

Das lineare Gradientenprofil sah wie folgt aus:
0-14,5 min, 0% B; 21 min, 25% B; 39 min, 35% B; 39-40 min, 35%. B, 41 min, 100% B; 41-47 min, 100% B; 49 min, 0% B; 49-53 min, 0% B.
Die Flußrate betrug 1 ml min^{-1}.

Das Injektionsvolumen pro Probe betrug 5 µl.

2.11. Angaben zur Statistik

Die angegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen basieren auf jeweils mindestens vier Meßwerten. Alle Pflanzenproben stellten Mischproben aus 5-20 Individuen dar. Für alle Fragestellungen wurden mindestens zwei voneinander unabhängige Mischproben analysiert. Die Messung jeder Mischprobe wurde mindestens zweimal wiederholt.

3. Ergebnisse

3.1. Wirkungen verschiedener Nitrat- bzw. Ammoniumkonzentrationen auf den pflanzlichen Stoffwechsel

3.1.1. Einfluß auf Biomasseproduktion und Vitalitätsparameter (Pigment- und Proteingehalte)

Zum Zeitpunkt der Ernte befanden sich die Weizenpflanzen im Dreiblatt- und die Maispflanzen im Vierblattstadium.

Die Biomasse der Weizen- und Maispflanzen variierte in Abhängigkeit von der N-Quelle und der N-Dosis. Höhere Stickstoffgaben führten zu einer Steigerung der Biomasseproduktion, wobei nitraternährte Pflanzen generell mehr Biomasse aufwiesen als ammoniumernährte (Abb. 3.1).

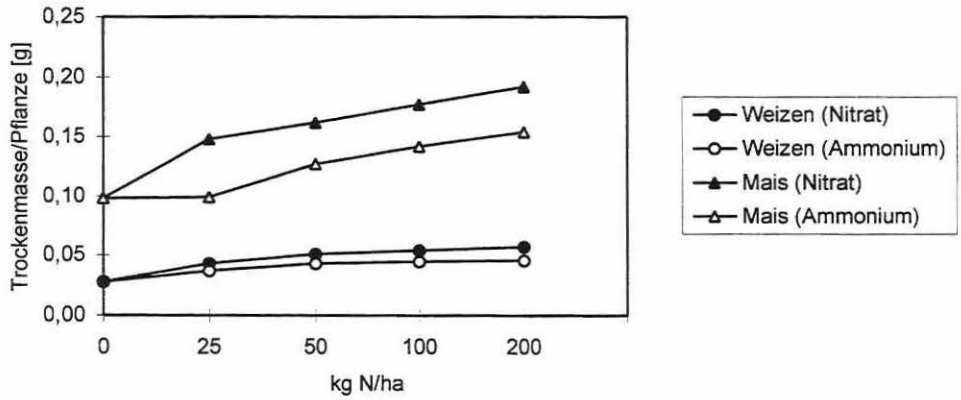

Abb. 3.1 Trockenmasse pro Pflanze in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=20)

Das Sproß/Wurzel-Verhältnis stieg mit der applizierten N-Dosis an (Tab. 3.1).

Für Weizenpflanzen, die auf Nitrat gewachsen waren, wurden deutlich höhere Sproß/Wurzel-Verhältnisse gefunden als für Pflanzen, denen Ammonium als alleinige N-Quelle zur Verfügung stand. Bei Mais wurden nur relativ geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Düngungsvarianten festgestellt.

Tab. 3.1 Sproß/Wurzel-Verhältnisse von Weizen- und Maispflanzen in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=20)

	SPROß/WURZEL-VERHÄLTNIS			
	WEIZEN		MAIS	
kg N/ha	Nitrat	Ammonium	Nitrat	Ammonium
0	1,33		1,65	
25	2,91	2,08	2,08	1,68
50	3,64	2,58	2,24	2.00
100	3,91	2,75	2,54	2,23
200	4,18	2,83	2,62	2,50

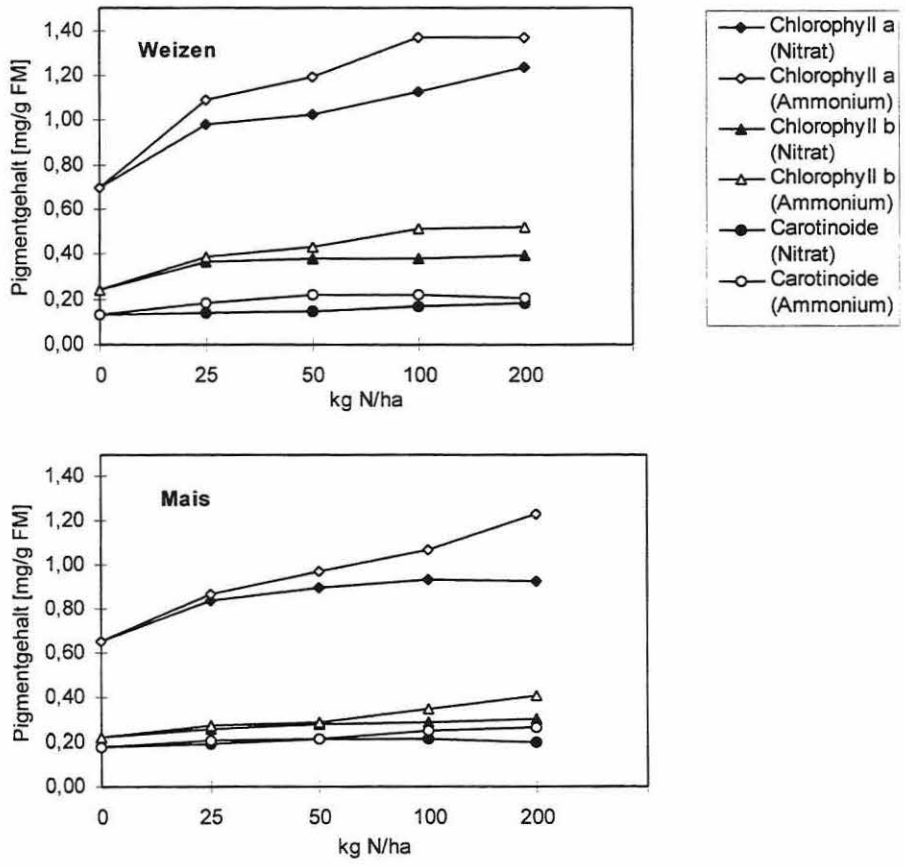

Abb. 3.2 Pigmentgehalte in Blättern von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6)

Zur Einschätzung des Vitalitätszustandes der Pflanzen wurden die Gehalte an Pigmenten und an löslichem Protein bestimmt (Abb. 3.2-3.3). Mit steigender Stickstoffdosis nahm insbesondere der Gehalt an Chlorophyll a zu oder stagnierte auf hohem Niveau (Mais: Nitratgaben > 50 kg N/ha). Pflanzen, die auf Ammonium gewachsen waren, wiesen etwas höhere Pigmentgehalte auf als Nitratpflanzen.

Bei Erhöhung der Ammonium- oder Nitratgaben konnte in den Blättern und Wurzeln beider Arten ein Anstieg des Gehaltes an löslichem Protein beobachtet werden (Abb. 3.3). Dabei wurden für Ammonium geringfügig niedrigere Werte (Ausnahme: Maisblätter) gefunden.

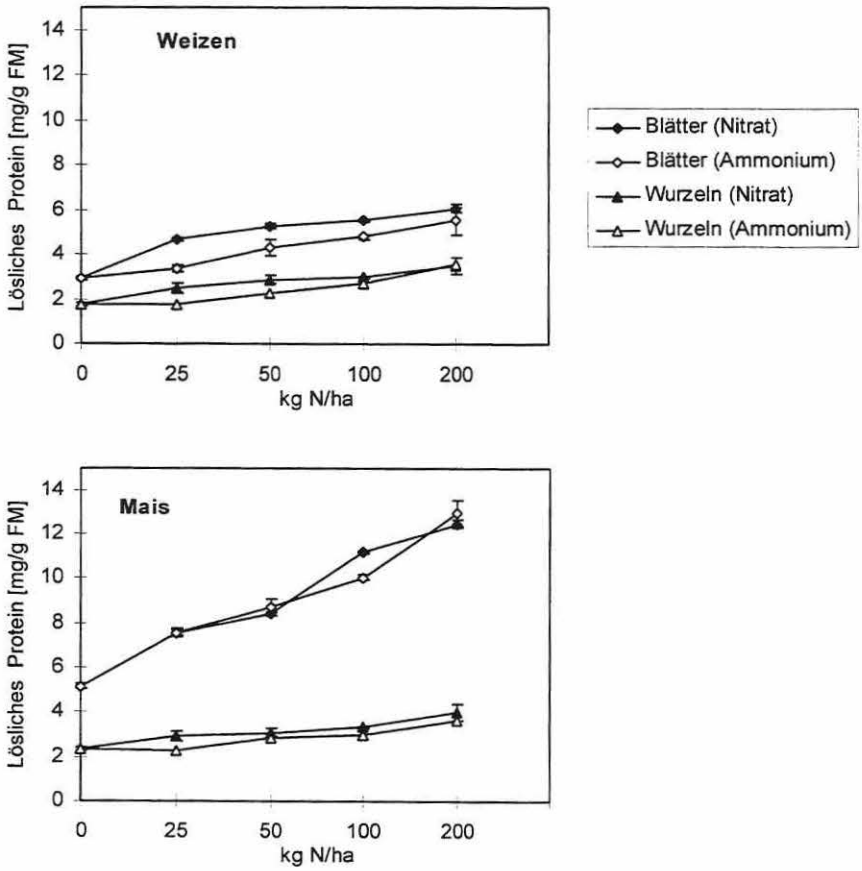

Abb. 3.3 Gehalte an löslichem Protein in Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6)

3.1.2. Einfluß auf die Aktivitäten stickstoffassimilierender Enzyme

In Blättern von Weizen und Mais wurden - bezogen auf die Frischmasse - vergleichbare **NADH-Nitratreduktase-Aktivitäten** gefunden. Auf steigende Nitratkonzentrationen reagierte die NADH-Nitratreduktase bei beiden Pflanzenarten mit einer deutlichen Erhöhung der Enzymaktivität (Abb. 3.4).

Pflanzen, die auf Ammoniumsulfat angezogen wurden, wiesen eine sehr geringe Nitratreduktase-Aktivität auf, die ebenfalls in Abhängigkeit von der Ammoniumkonzentration anstieg. Dieser Effekt war bei Mais weitaus deutlicher als bei Weizen.

In den Blättern N-frei angezogener Pflanzen wurde keine Nitratreduktase-Aktivität festgestellt.

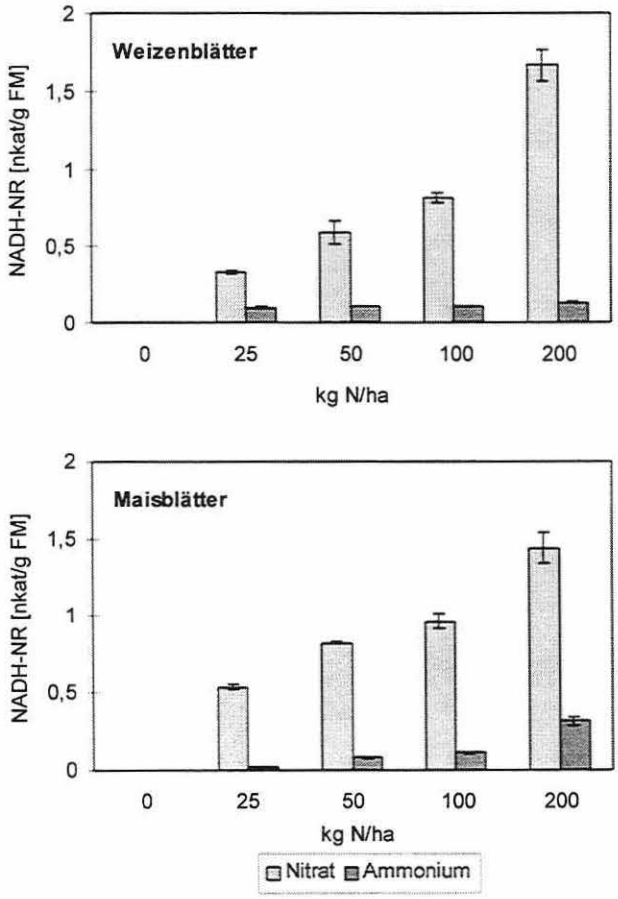

Abb. 3.4 NADH-Nitratreduktase-Aktivitäten in Weizen- und Maisblättern in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6)

Die Testung der Wurzelextrakte von Weizen und Mais führte ebenfalls zu negativen Ergebnissen.

Die **Nitritreduktase-Aktivitäten** aus Blättern beider Arten stiegen unter Nitrateinfluß deutlich an, wobei in Weizenblättern weitaus höhere Aktivitäten gefunden wurden als in Mais (Abb. 3.5).

Das Enzym aus Weizen reagierte auch auf eine Erhöhung der Ammoniumkonzentration in der Nährlösung mit einer leichten Steigerung der Aktivität.

In den Blättern N-frei angezogener Pflanzen wurden nur geringe Nitritreduktase-Aktivitäten gefunden.

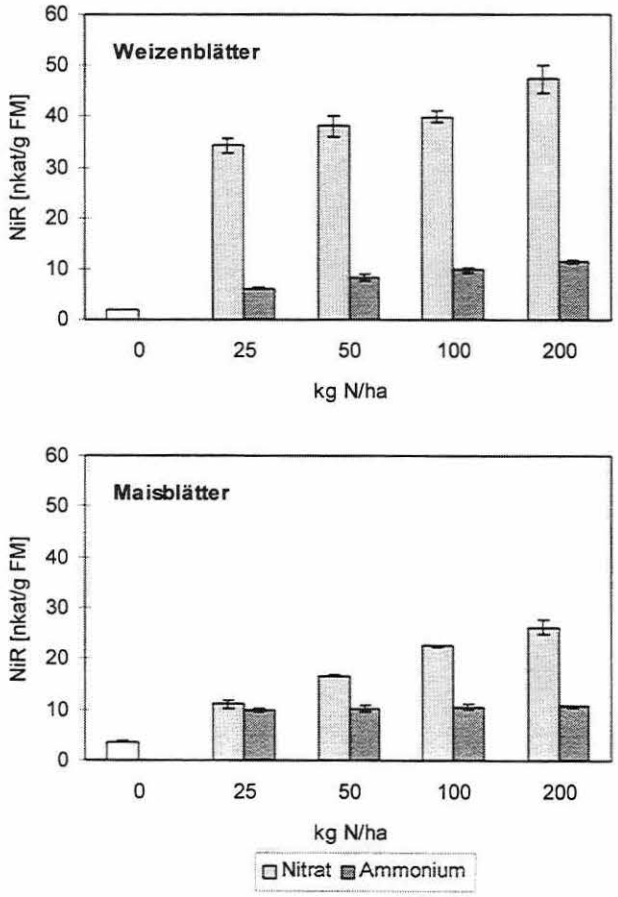

Abb. 3.5 Nitritreduktase-Aktivitäten in Blättern von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6)

Wie in Abb. 3.6 zu sehen ist, konnten in Weizenblättern **Glutaminsynthetase-Aktivitäten** nachgewiesen werden, die um ein Vielfaches höher lagen als die in Maisblättern bestimmten Werte.

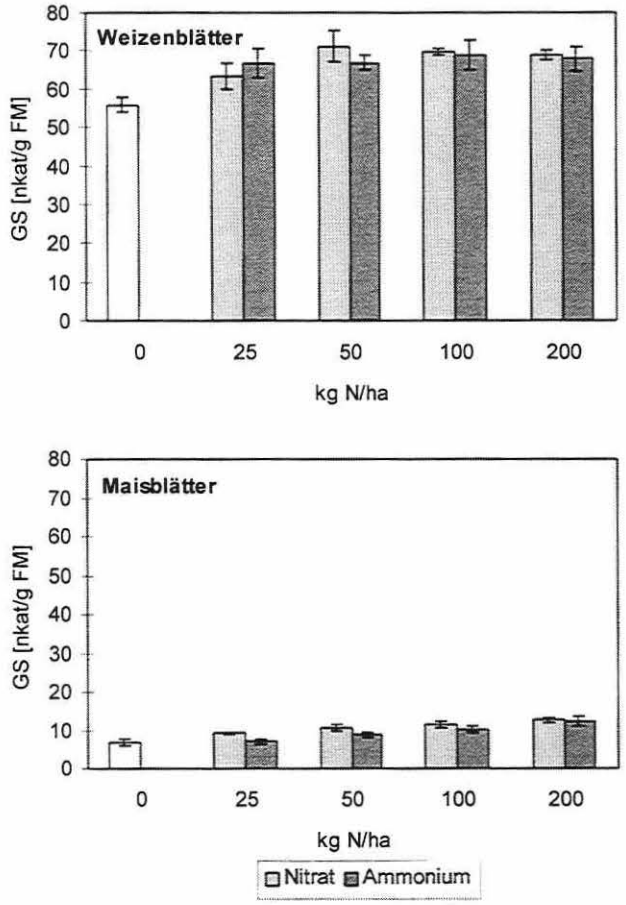

Abb. 3.6 Glutaminsynthetase-Aktivitäten aus Blättern von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6)

Pflanzen, die mit Stickstoff in Form von Nitrat oder Ammonium versorgt wurden, wiesen leicht erhöhte Glutaminsynthetase-Aktivitäten im Vergleich zu N-frei angezogenen Pflanzen auf; dabei waren aber weder in Bezug auf die N-Form noch auf die N-Konzentration deutliche Unterschiede zu beobachten.

Die Wurzel-GS zeigte ein entgegengesetztes Verhalten bei Weizen und Mais. Das Enzym aus Weizenwurzeln reagierte auf NH_4^+ mit einer starken Aktivitätserhöhung, während bei Maiswurzeln ein solcher Effekt unter NO_3^--Einfluß auftrat (Abb. 3.7).

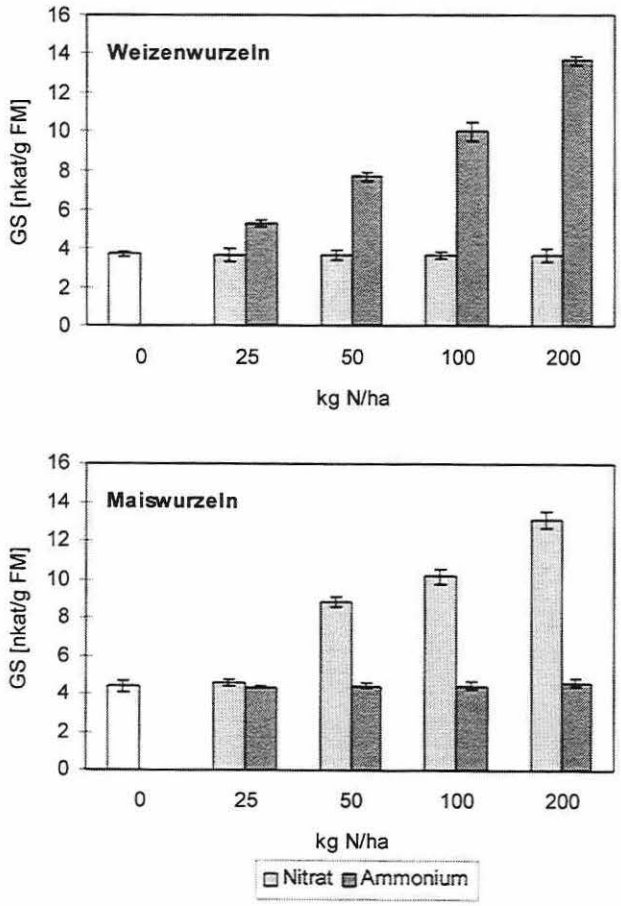

Abb. 3.7 Glutaminsynthetase-Aktivitäten aus Wurzeln von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6)

Die **NADH-Glutamatdehydrogenase** aus Weizenblättern reagierte auf steigende NH_4^+-Konzentrationen in der Nährlösung zunächst mit einer deutlichen Erhöhung der Enzymaktivität. Ammoniumgaben über 50 kg N/ha bewirkten keine weitere Aktivitätssteigerung. Nitratpflanzen zeigten vergleichsweise niedrige Aktivitäten, die auch nur zaghaft anstiegen.

Das Enzym aus Maisblättern wurde durch Nitratdüngung kaum beeinflußt, Ammonium bewirkte lediglich einen leichte Stimulierung der Aktivität (Abb. 3.8).

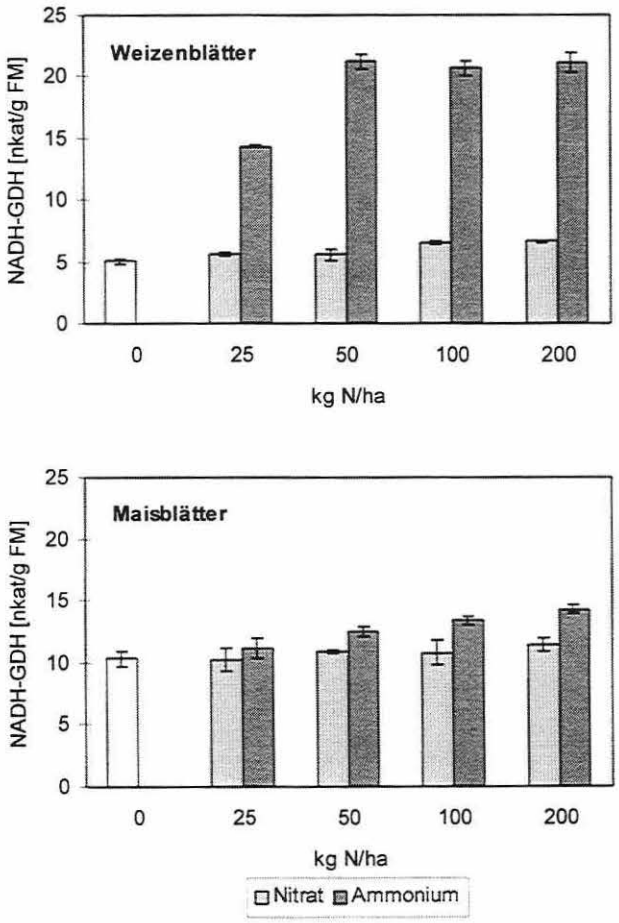

Abb. 3.8 NADH-Glutamatdehydrogenase-Aktivitäten aus Blättern von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6)

Für die NADH-Glutamatdehydrogenase aus den Wurzeln beider Arten wurde unter Ammoniumeinfluß eine Steigerung der Enzymaktivität gefunden, wobei nitratgedüngte Pflanzen lediglich geringe Effekte aufwiesen (Abb. 3.9).

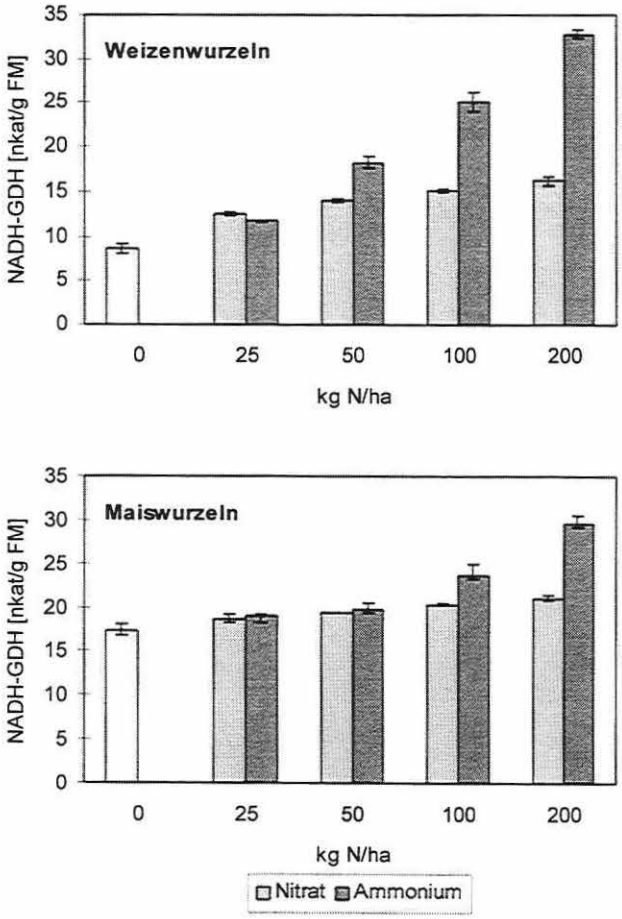

Abb. 3.9 NADH-Glutamatdehydrogenase-Aktivitäten aus Wurzeln von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6)

3.1.3. Ammoniumgehalte

In Weizen wurden stets signifikant höhere zelluläre Ammoniumkonzentrationen gefunden als in Mais (Abb. 3.10). Bei Ammonium-Düngung stieg der Ammoniumgehalt in Blättern und Wurzeln von Weizen deutlich an. In Maisblättern konnte kaum eine Steigerung des NH_4^+-Gehaltes verzeichnet werden; Maiswurzeln reagierten auf Ammoniumdüngung mit einer leichten Erhöhung des NH_4^+-Gehaltes.

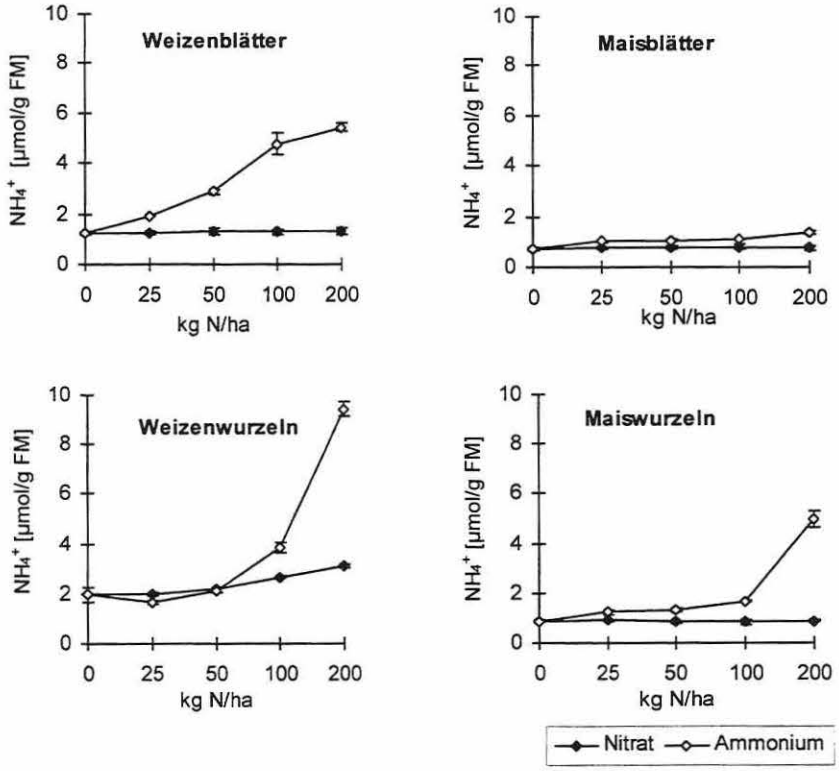

Abb: 3.10 Einfluß der N-Versorgung auf die Ammoniumgehalte in Blättern und Wurzeln von Weizen und Mais (n=6)

3.1.4. Nitratgehalte

In den Blättern und Wurzeln von Weizen- und Maispflanzen wurde eine Erhöhung der zellulären NO_3^--Gehalte in direkter Abhängigkeit vom Nitratangebot in der Nährlösung festgestellt (Abb. 3.11).

Das Nitrat wurde bei beiden Arten in erster Linie in den Blättern gefunden, wobei die Anstiege der Nitratgehalte in Weizen deutlich größer waren.

Ammoniumdüngung hatte keinen Einfluß auf den zellulären Nitratgehalt.

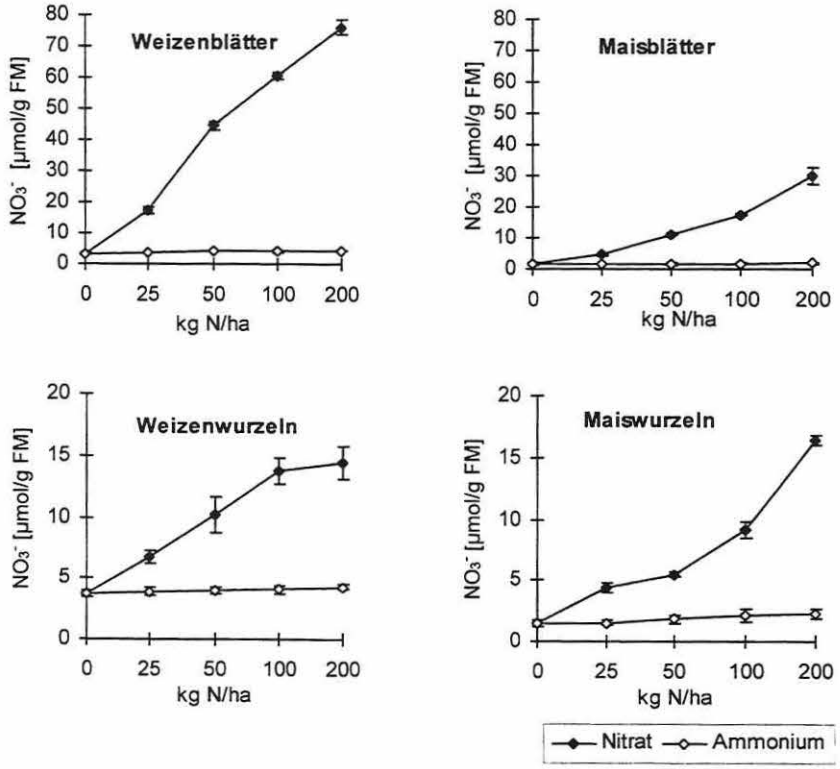

Abb. 3.11 Einfluß der N-Versorgung auf die Nitratgehalte in Blättern von Weizen und Mais (n=6)

3.1.5. Nitritgehalte

Es konnte in den Pflanzenfraktionen von Weizen und Mais kein zelluläres Nitrit nachgewiesen werden.

3.1.6. Gesamtstickstoffgehalte

Mit steigendem Stickstoffangebot im Bodensubstrat erhöhten sich die N-Gehalte in Weizen- und Maispflanzen (Abb. 3.12). Bei hohen N-Angeboten (100 bzw. 200 kg N/ha) wurden in nitratgedüngten Weizenpflanzen geringere Stickstoffgehalte als in mit Ammonium oder Ammoniumnitrat versorgten Pflanzen gefunden. Maispflanzen wiesen nur geringe Unterschiede im N-Gehalt auf, wenn sie auf Nitrat oder Ammonium angezogen wurden; Ammoniumnitratdüngung verursachte jedoch höhere Stickstoffgehalte.
Generell waren die N-Gehalte pro g Trockenmasse bei Mais deutlich niedriger als bei Weizen.

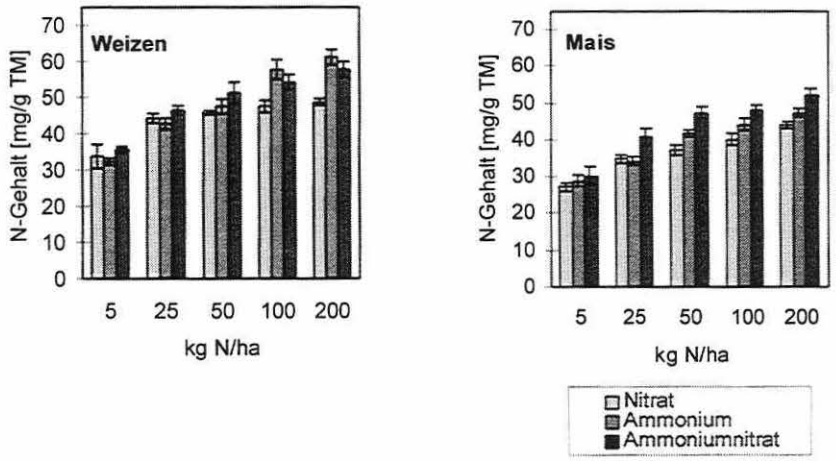

Abb. 3.12 Stickstoffgehalte pro g Trockenmasse in Weizen und Mais (Gesamtpflanze) in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6)

In Abb. 3.13 sind die N-Gehalte pro g Trockenmasse für die einzelnen Pflanzenfraktionen (Blätter, Stengel, Wurzeln) dargestellt. Dabei fallen insbesondere die niedrigeren Stickstoffwerte für Maisblätter im Vergleich zu Weizenblättern auf.

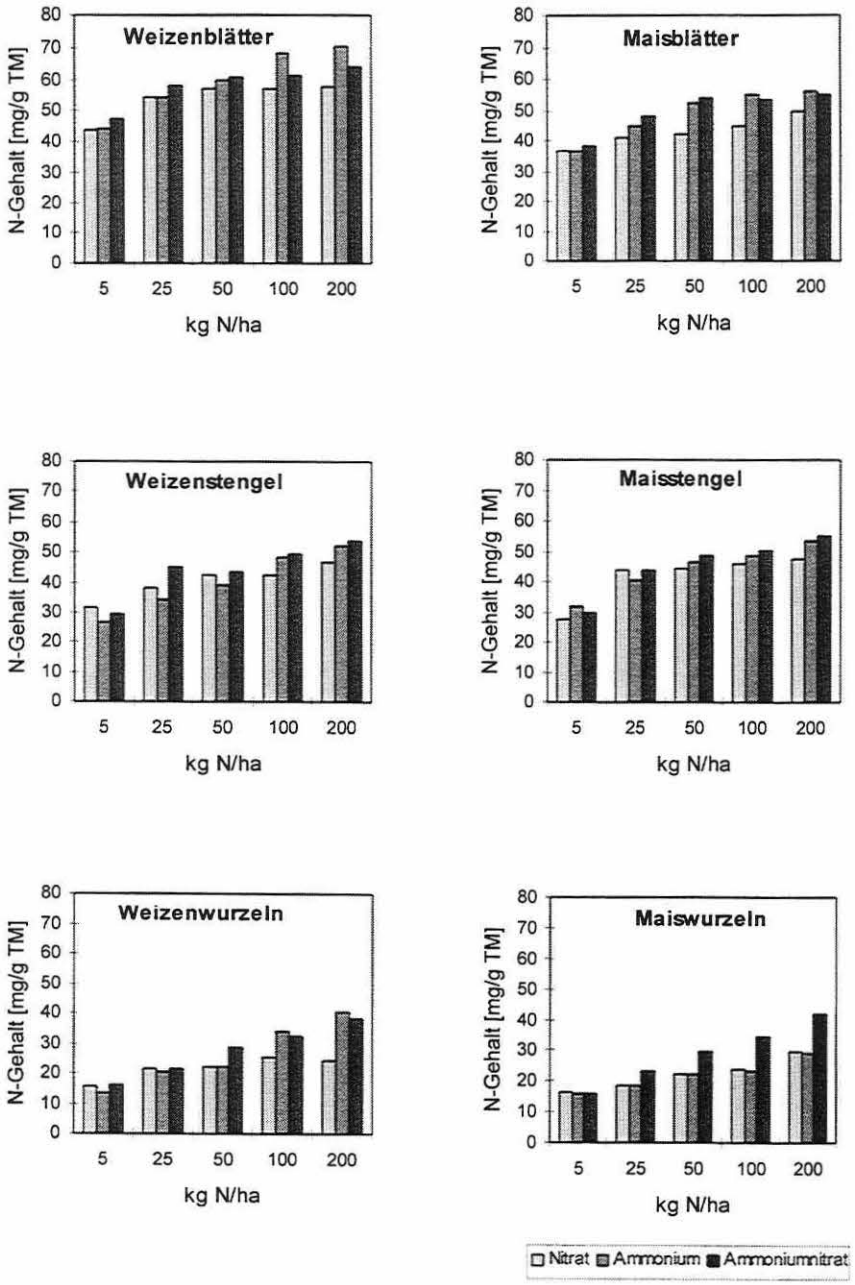

Abb. 3.13 Stickstoffgehalte in verschiedenen Pflanzenfraktionen von Weizen und Mais in Abhängigkeit vom N-Angebot im Bodensubstrat (n=6)

3.1.7. Ergebnisse der ^{15}N-Tracerversuche

In Abb. 3.14 sind die ^{15}N-Exzeßmassen pro g Trockenmasse (Gesamtpflanze) dargestellt.
Wenn $^{15}NO_3^-$ bzw. $^{15}NH_4^+$ als alleinige Stickstoffquelle zur Verfügung standen, wurden bei Maispflanzen nur geringe Unterschiede im ^{15}N-Aufnahmeverhalten festgestellt. Für Weizenpflanzen dagegen wurden bei N-Gaben ab 50 kg N/ha deutlich höhere N-Aufnahmeraten für Ammoniumstickstoff gefunden.
Weiterhin konnte festgestellt werden, daß Weizenpflanzen bezogen auf die Trockenmasse höhere Aufnahmeraten für Nitrat und Ammonium zeigten als Mais.

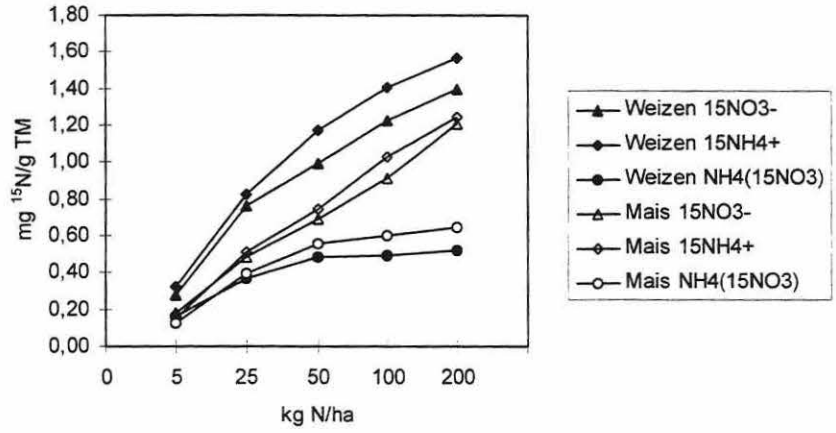

Abb. 3.14 ^{15}N-Exzeßmassen pro g Trockenmasse (Gesamtpflanze) bei Weizen und Mais in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle (n=6)

Die Bestimmung der ^{15}N-Exzeßmassen in Pflanzen, die auf $NH_4{}^{15}NO_3$ gewachsen waren, ergab für Mais höhere Werte pro g Trockenmasse als für Weizen.
Beim Vergleich der Nitrataufnahme aus $K^{15}NO_3$ und $NH_4{}^{15}NO_3$ ist zu berücksichtigen, daß im Fall der Ammoniumnitratvariante nur die Hälfte des insgesamt angebotenen Stickstoffs (der Nitratanteil) mit 5 Atom% ^{15}N-markiert war. Um den Einfluß des gleichzeitig anwesenden Ammonium-N auf die Nitrataufnahme einzuschätzen, werden in Abb. 3.15 Pflanzen verglichen, die bezogen auf die Nitratmenge dasselbe N-Angebot erhalten haben (zum Beispiel 50 kg N/ha $K^{15}NO_3$ und 100 kg N/ha $NH_4{}^{15}NO_3$).

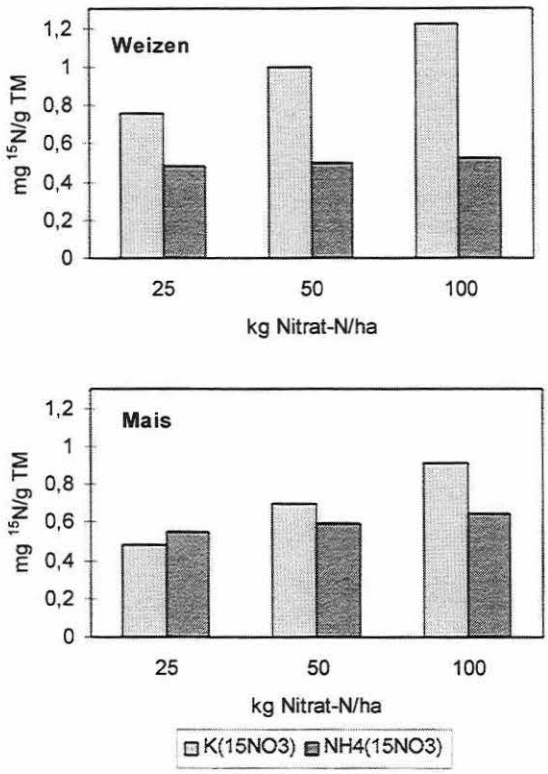

Abb. 3.15 Vergleich der Nitrataufnahme aus $K^{15}NO_3$ und $NH_4{}^{15}NO_3$ (n=6)

Weizenpflanzen, denen Ammoniumnitrat appliziert wurde, nahmen deutlich weniger Nitrat auf als Pflanzen, die auf Kaliumnitrat gewachsen waren. Je höher die Nitrat- und damit auch die Ammoniumkonzentration war, um so größer war die Diskrepanz in der Nitrataufnahme.
Bei Maispflanzen zeigte sich, daß die Nitrataufnahme durch die Anwesenheit von Ammonium noch gesteigert werden konnte (siehe die Werte für 25 kg Nitrat-N/ha). Wurden höhere Ammoniumnitratgaben verabreicht, trat auch hier eine im Vergleich zu ausschließlich nitraternährten Pflanzen verminderte $^{15}NO_3^-$ - Aufnahme auf. Dieser Effekt fiel allerdings geringer aus als bei Weizen.

In Bezug auf die Verteilung der ^{15}N-Markierung auf die Pflanzenfraktionen (Blätter, Stengel, Wurzeln) konnte festgestellt werden, daß in Weizen der größte Teil des ^{15}N in den Blättern zu finden war. Ammoniumernährte Pflanzen wiesen besonders viel ^{15}N im Blattmaterial und relativ wenig in der Sproßachse auf. Pflanzen, die auf $NH_4{}^{15}NO_3$ gewachsen waren, enthielten vergleichsweise mehr ^{15}N in den Wurzeln als die anderen beiden Varianten (Abb. 3.16).

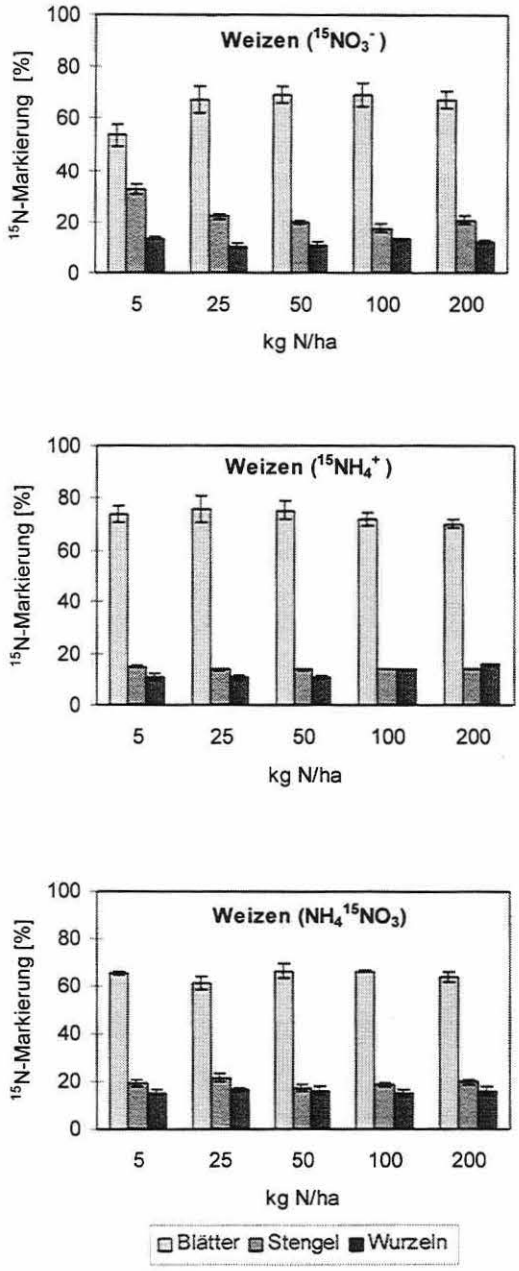

Abb 3.16 Prozentuale Verteilung der ^{15}N-Markierung auf die Pflanzenfraktionen von Weizen (n=6)

In Maispflanzen, die $K^{15}NO_3$ bzw. $NH_4{}^{15}NO_3$ erhalten hatten, befand sich ca. die Hälfte des aufgenommenen ^{15}N in den Blättern. Das war anteilmäßig deutlich weniger als bei Weizenpflanzen. Bei $(^{15}NH_4)_2SO_4$-gedüngten Maispflanzen wurden 50-65% des ^{15}N in den Blättern gefunden, die Wurzeln enthielten relativ geringe Werte.

In den Sproßachsen der Maispflanzen wurde mit 27-49% ein recht großer Anteil des aufgenommenen ^{15}N festgestellt (Abb. 3.17).

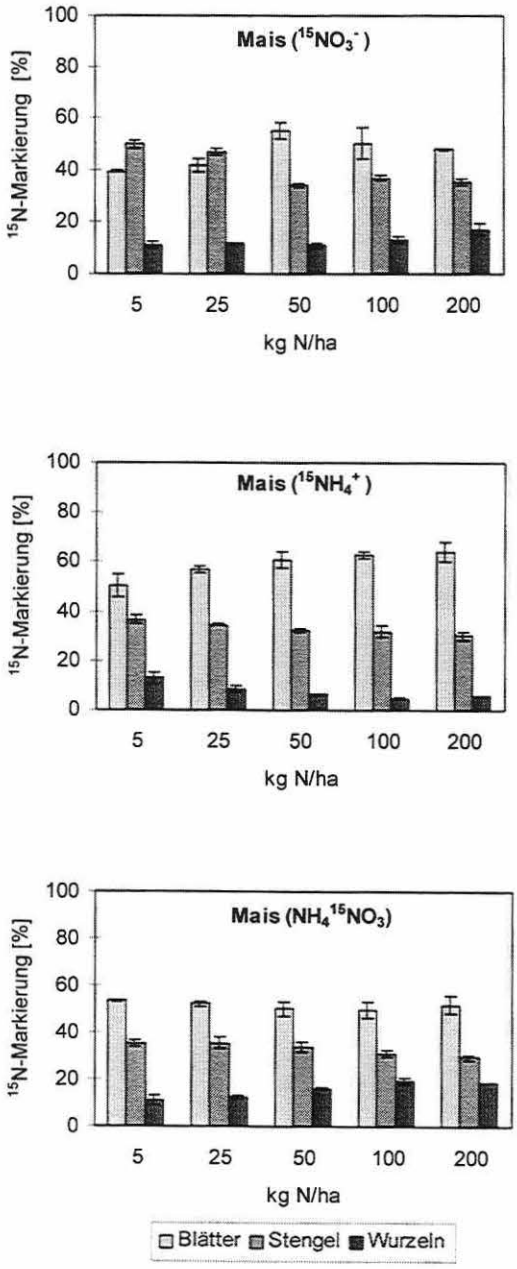

Abb. 3.17 Prozentuale Verteilung der ^{15}N-Markierung auf die Pflanzenfraktionen von Mais (n=6)

3.1.8. Ergebnisse der Aminosäurenanalyse

Es wurden die Gehalte an ausgewählten freien Aminosäuren in Pflanzen bestimmt, die mit Nitrat oder Ammonium (50 und 200 kg N/ha) gedüngt worden waren.

In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse für Weizen dargestellt. Der herausragendste Effekt wurde bei den Asparagingehalten festgestellt; die Ammoniumpflanzen enthielten ein Vielfaches an Asparagin im Vergleich zu Nitratpflanzen. Die absolut höchsten Werte wurden für 200 kg N/ha Ammoniumanzucht gefunden, die Stengel wiesen dabei höhere, die Wurzeln deutlich niedrigere Gehalte auf als die Blätter.

Auch die Glutamingehalte stiegen unter Ammoniumeinfluß stärker an. In den Blättern von nitratgedüngten Pflanzen wurde dagegen höhere Glutamatgehalte bestimmt.

In Blättern und Stengeln von Weizenpflanzen, die die höchste Ammoniumgabe erhalten hatten, waren erhöhte Argininggehalte zu verzeichnen. Im Vergleich zu den anderen Aminosäuren war der absolute Arg-Gehalt jedoch als niedrig einzuschätzen.

Ammoniumpflanzen enthielten in ihren Blättern ca. doppelt so viel Alanin wie Nitratpflanzen.

In Analogie zu Weizen war auch in Maispflanzen ein dramatischer Anstieg des Asparagingehaltes bei Ammoniumeinfluß zu beobachten, absolut gesehen lagen die Werte für Mais aber unter denen für Weizen (Tab. 3.3).

Ammonium bewirkte einen stärkeren Anstieg der Glutamingehalte in Blättern und Stengeln; die Aspartat- und Glutamatgehalte waren bei beiden N-Formen vergleichbar.

Die Argininggehalte stiegen insbesondere in den Stengeln bei erhöhtem N-Angebot an; dabei waren aber keine bedeutenden Unterschiede zwischen Nitrat- und Ammoniumanzucht zu verzeichnen.

Auch für Serin, Glycin und Alanin wurde gefunden, daß die Gehalte in Blättern und Stengeln bei erhöhter N-Gabe stiegen, wobei die Werte für Ammoniumpflanzen stets höher lagen.

Tab. 3.2 Gehalte an freien Aminosäuren in Weizenpflanzen in Abhängigkeit von der N-Versorgung (n=6)

	Aminosäurengehalte [µmol/g Trockenmasse]			
	Nitrat		Ammonium	
	50 kg N/ha	200 kg N/ha	50 kg N/ha	200 kg N/ha
	WEIZENBLÄTTER			
Asn	1,06 ± 0,13	5,24 ± 0,11	74,78 ± 0,50	264,86 ± 9,14
Gln	5,06 ± 0,16	7,14 ± 0,09	14,22 ± 0,23	27,08 ± 0,62
Asp	16,74 ± 0,79	18,71 ± 0,07	17,42 ± 0,16	16,02 ± 0,64
Ser	22,95 ± 0,13	27,48 ± 1,04	32,39 ± 0,46	46,56 ± 0,47
Glu	9,05 ± 0,65	14,24 ± 0,39	1,11 ± 0,05	2,33 ± 2,59
Arg	1,00 ± 0,06	0,83 ± 0,08	0,72 ± 0,03	2,39 ± 0,03
Gly	2,36 ± 0,03	2,76 ± 0,56	2,12 ± 0,08	2,50 ± 0,13
Ala	18,86 ± 0,13	19,83 ± 0,57	35,42 ± 0,46	42,50 ± 0,97
Pro	1,21 ± 0,08	2,79 ± 0,18	2,13 ± 0,06	2,08 ± 0,05
	WEIZENSTENGEL			
Asn	15,11 ± 0,56	28,27 ± 0,87	156,98 ± 5,27	394,73 ± 14,6
Gln	5,37 ± 0,14	12,56 ± 0,20	9,79 ± 0,40	17,20 ± 0,41
Asp	9,41 ± 0,08	18,23 ± 0,37	6,05 ± 0,25	11,70 ± 0,60
Ser	10,69 ± 0,23	18,78 ± 0,42	13,25 ± 0,48	23,86 ± 0,58
Glu	6,98 ± 0,09	13,33 ± 0,39	2,69 ± 0,01	10,38 ± 0,47
Arg	0,87 ± 0,11	1,10 ± 0,01	1,34 ± 0,08	5,35 ± 0,05
Gly	1,26 ± 0,02	1,78 ± 0,17	2,22 ± 0,13	2,94 ± 0,02
Ala	11,26 ± 0,15	14,66 ± 0,70	9,46 ± 0,03	15,23 ± 0,12
Pro	0,96 ± 0,04	1,46 ± 0,05	1,56 ± 0,05	1,69 ± 0,04
	WEIZENWURZELN			
Asn	10,87 ± 0,18	9,08 ± 0,05	49,67 ± 0,01	120,59 ± 22,0
Gln	7,09 ± 0,14	6,64 ± 0,06	14,88 ± 0,06	29,88 ± 0,21
Asp	6,96 ± 0,07	8,48 ± 0,05	5,47 ± 0,05	5,63 ± 0,03
Ser	3,52 ± 0,15	3,94 ± 0,14	3,97 ± 0,05	4,31 ± 0,11
Glu	5,64 ± 0,05	7,89 ± 0,35	3,92 ± 0,01	4,36 ± 0,01
Arg	0,32 ± 0,00	0,77 ± 0,05	0,85 ± 0,08	0,82 ± 0,03
Gly	0,90 ± 0,01	0,94 ± 0,06	1,08 ± 0,04	1,15 ± 0,13
Ala	6,01 ± 0,19	6,02 ± 0,12	4,59 ± 0,15	5,48 ± 0,14
Pro	0,47 ± 0,01	0,57 ± 0,05	0,89 ± 0,01	1,93 ± 0,05

Tab. 3.3 Gehalte an freien Aminosäuren in Maispflanzen in Abhängigkeit von der N-Versorgung (n=6)

	Aminosäurengehalte [µmol/g Trockenmasse]			
	Nitrat		Ammonium	
	50 kg N/ha	200 kg N/ha	50 kg N/ha	200 kg N/ha
	MAISBLÄTTER			
Asn	0,65 ± 0,18	1,04 ± 0,05	11,07 ± 0,34	104,25 ± 3,47
Gln	1,02 ± 0,01	1,28 ± 0,06	2,10 ± 0,06	9,35 ± 0,11
Asp	5,40 ± 0,17	8,28 ± 0,31	4,15 ± 0,19	6,09 ± 0,34
Ser	4,03 ± 0,27	5,55 ± 0,24	4,31 ± 0,09	12,20 ± 0,43
Glu	14,32 ± 0,28	23,87 ± 0,53	13,15 ± 0,12	22,19 ± 0,75
Arg	0,27 ± 0,04	0,51 ± 0,12	0,46 ± 0,35	0,67 ± 0,02
Gly	1,47 ± 0,23	1,68 ± 0,16	2,67 ± 0,00	13,32 ± 0,35
Ala	13,94 ± 0,11	18,54 ± 0,11	17,55 ± 0,68	49,49 ± 3,85
Pro	0,70 ± 0,01	1,24 ± 0,09	1,29 ±0,01	2,05 ± 0,10
	MAISSTENGEL			
Asn	1,81 ± 0,33	8,44 ± 0,14	28,58 ± 0,07	259,13 ± 28,4
Gln	6,01 ± 0,13	13,76 ± 0,05	9,20 ± 0,17	60,61 ± 6,55
Asp	10,13 ± 0,50	20,64 ± 0,14	4,92 ± 0,37	16,34 ± 0,13
Ser	10,51 ± 0,13	20,62 ± 0,28	10,91 ± 0,31	28,55 ± 0,50
Glu	14,65 ± 0,80	22,26 ± 0,04	15,57 ± 0,46	21,93 ± 0,06
Arg	2,28 ± 0,08	4,58 ± 0,08	1,26 ± 0,11	4,58 ± 0,02
Gly	3,51 ± 0,13	10,65 ± 0,25	7,74 ± 0,01	39,17 ± 2,28
Ala	7,21 ± 0,08	18,53 ± 0,27	12,05 ± 0,08	28,09 ± 1,97
Pro	1,05 ± 0,02	1,95 ± 0,02	1,35 ± 0,04	2,67 ± 0,03
	MAISWURZELN			
Asn	5,35 ± 0,07	11,68 ± 0,82	15,56 ± 0,93	11,74 ± 0,12
Gln	4,51 ± 0,00	8,12 ± 0,26	8,79 ± 0,34	7,63 ± 0,11
Asp	5,58 ± 0,08	9,31 ± 0,17	4,54 ± 0,01	8,88 ± 0,02
Ser	8,81 ± 0,38	9,96 ± 0,69	11,43 ± 0,55	9,87 ± 0,02
Glu	5,61 ± 0,16	8,14 ± 0,07	5,43 ± 0,05	7,77 ± 0,07
Arg	0,79 ± 0,10	0,80 ± 0,05	0,70 ± 0,04	1,26 ± 0,04
Gly	3,13 ± 0,37	3,57 ± 0,12	3,29 ± 0,05	4,84 ± 0,26
Ala	7,34 ± 0,33	9,14 ± 0,63	10,57 ± 0,27	9,14 ± 0,17
Pro	1,27 ± 0,05	1,38 ± 0,03	1,89 ± 0,06	1,31 ± 0,01

3.2. Ergebnisse der $^{15}NO_2$-Exposition

3.2.1. Enzymaktivitäten, Pigment-, Ammonium- und Nitritgehalte

Die Aktivitäten N-assimilierender Enzyme in den Blättern der Kontroll- bzw. der $^{15}NO_2$-behandelten Pflanzen sind in Tab. 3.4 dargestellt. Wie hieraus hervorgeht, konnte unter den gegebenen Bedingungen kein Einfluß auf die Enzymaktivitäten festgestellt werden.
Es liegen allerdings nur die Werte für die $^{15}NO_2$-Exposition mit 25 ppb vor, da beim Transport des mit 50 ppb exponierten Pflanzenmaterials Probleme auftauchten (Erwärmung der geernteten Pflanzen auf ca. 0°C), die die nachfolgenden Enzymaktivitätsmessungen nicht mehr erlaubten.

Tab. 3.4 Enzymaktivitäten in Blättern von Weizen und Mais nach 8 h $^{15}NO_2$-Exposition (25 ppb) im Vergleich zu unbegasten Kontrollpflanzen
Variante I: 50 kg N/ha in Nitratform gegeben
Variante II: 200 kg N/ha in Nitratform gegeben
(n=4)

	NADH-NR [nkat/g FM]	**NiR** [nkat/g FM]	**GS** [nkat/g FM]	**NADH-GDH** [nkat/g FM]
Weizen I Kontrolle	0,60 ± 0,07	37,04 ± 1,87	71,09 ± 6,83	5,48 ± 0,38
Weizen I $^{15}NO_2$	0,62 ± 0,05	38,50 ± 2,07	68,85 ± 4,64	5,52 ± 0,41
Weizen II Kontrolle	1,66 ± 0,10	48,88 ± 2,72	69,98 ± 3,41	6,75 ± 0,10
Weizen II $^{15}NO_2$	1,64 ± 0,12	47,94 ± 2,79	70,07 ± 4,56	6,77 ± 0,17
Mais I Kontrolle	0,82 ± 0,01	17,10 ± 0,30	10,47 ± 0,52	10,45 ± 0,67
Mais I $^{15}NO_2$	0,84 ± 0,02	17,43 ± 1,21	10,97 ± 0,85	10,84 ± 0,71
Mais II Kontrolle	1,40 ± 0,10	25,86 ± 1,11	13,29 ± 1,04	11,01 ± 0,56
Mais II $^{15}NO_2$	1,48 ± 0,08	26,35 + 0,90	14,27 ± 1,12	10,79 ± 0,83

In den Blättern von Weizen und Mais waren infolge der NO_2-Exposition leicht erhöhte Pigmentgehalte festzustellen. Die Gehalte an zellulären Ammoniumionen wurden dagegen kaum beeinflußt. Nitrit konnte nicht nachgewiesen werden.

Tab. 3.5 Pigment- und Ammoniumgehalte in Blättern von Weizen und Mais nach 8 h $^{15}NO_2$- Exposition (25 ppb) im Vergleich zu unbegasten Kontrollpflanzen
Variante I: 50 kg N/ha in Nitratform gegeben
Variante II: 200 kg N/ha in Nitratform gegeben
(n=4)

	Chlorophyll a [mg/g FM]	**Chlorophyll b [mg/g FM]**	**Carotinoide [mg/g FM]**	**NH_4^+-Gehalt [µmol/g FM]**
Weizen I Kontrolle	1,033 ± 0,001	0,367 ± 0,01	0,164 ± 0,005	1,354 ± 0,090
Weizen I $^{15}NO_2$	1,122 ± 0,020	0,405 ± 0,020	0,199 ± 0,008	1,380 ± 0,115
Weizen II Kontrolle	1,162 ± 0,001	0,422 ± 0,001	0,189 ± 0,001	1,423 ± 0,086
Weizen II $^{15}NO_2$	1,292 ± 0,021	0,487 ± 0,021	0,195 ± 0,001	1,440 ± 0,109
Mais I Kontrolle	0,463 ± 0,001	0,147 ± 0,01	0,111 ± 0,002	0,815 ± 0,066
Mais I $^{15}NO_2$	0,551 ± 0,002	0,173 ± 0,002	0,126 ± 0,004	0,791 ± 0,098
Mais II Kontrolle	0,742 ± 0,008	0,242 ± 0,008	0,153 ± 0,002	0,775 ± 0,054
Mais II $^{15}NO_2$	0,857 ± 0,017	0,286 ± 0,017	0,176 ± 0,009	0,801 ± 0,072

3.2.2. $^{15}NO_2$-Aufnahme

In Abb. 3.18 sind die ^{15}N-Exzeßmassen dargestellt, die pro Pflanze (Blätter, Sproßachse, Wurzeln) gefunden wurden.

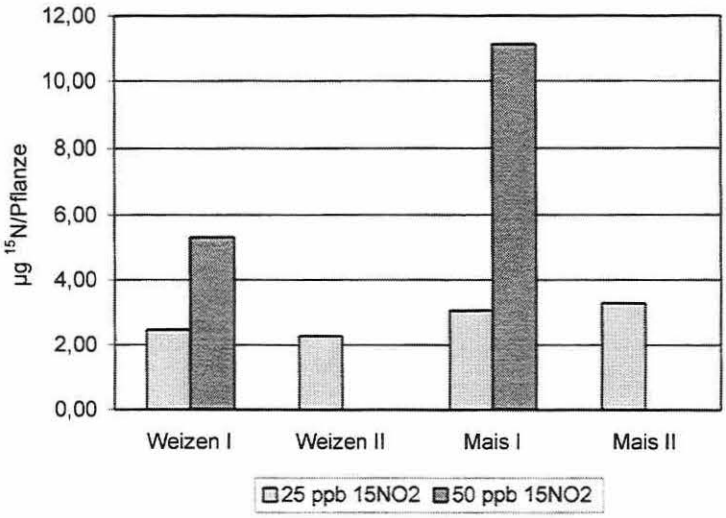

Abb. 3.18 ^{15}N-Gehalte pro Weizen- bzw. Maispflanze nach 8h $^{15}NO_2$-Exposition (10,25 Atom%) in Abhängigkeit von der $^{15}NO_2$-Expositionskonzentration und dem N-Angebot im Bodensubstrat
I: 50 kg Nitrat-N/ha
II: 200 kg Nitrat-N/ha
(n=6)

Sowohl Weizen- als auch Maispflanzen haben demnach $^{15}NO_2$ in Abhängigkeit von der Expositionkonzentration aufgenommen. In Mais wurden absolut höhere ^{15}N-Exzeßmassen festgestellt, wobei aber die unterschiedliche Morphologie der beiden Arten zu beachten ist. Maispflanzen sind größer und verfügen über dementsprechend mehr Blattfläche, über welche $^{15}NO_2$ aufgenommen wird. Um das Aufnahmeverhalten der beiden Arten zu vergleichen, wurde daher die Blattfläche als Bezugsgröße gewählt (Abb. 3.19).

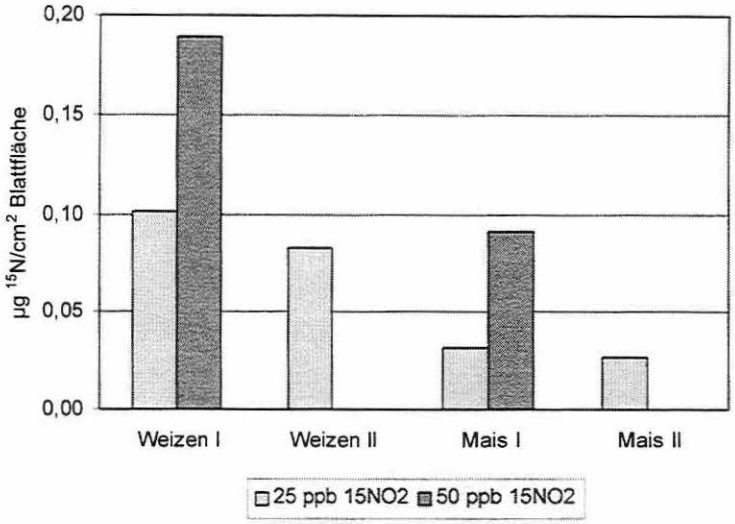

Abb. 3.19 ^{15}N-Gehalte in Weizen- und Maispflanzen pro Blattflächeneinheit nach 8 h $^{15}NO_2$-Exposition (10,25 Atom%) in Abhängigkeit von der $^{15}NO_2$-Expositionskonzentration und dem N-Angebot im Bodensubstrat
I: 50 kg Nitrat-N/ha
II: 200 kg Nitrat-N/ha
(n=6)

In dieser Darstellung wird deutlich, daß Weizenpflanzen weitaus größere $^{15}NO_2$-Mengen pro cm^2 Blattfläche aufgenommen haben als Maispflanzen. Bei beiden Arten wurde bei höheren Expositionskonzentrationen auch eine höhere $^{15}NO_2$-Aufnahme beobachtet. Der N-Versorgungsstatus war nur von geringer Bedeutung; Pflanzen, die über das Bodensubstrat höhere Nitratkonzentrationen erhielten, nahmen nur unwesentlich weniger $^{15}NO_2$ auf.

3.2.3. Verteilung der ^{15}N-Exzeßmasse auf Pflanzenfraktionen

Es wurde der ^{15}N-Exzeß-Gehalt in Blättern, Sproßachse und Wurzeln bestimmt (Abb. 3.20). Nach 8 h Begasung und nachfolgender sofortiger Ernte des Pflanzenmaterials konnte in allen Pflanzenteilen ^{15}N nachgewiesen werden; der Hauptanteil befand sich zu diesem Zeitpunkt in den Blättern. In Pflanzen, die 24 h nach Expositionsende geerntet wurden, war die ^{15}N-Markierung in den Blättern zwar gesunken und in Sproßachse bzw. Wurzeln erhöht, aber der größte Teil war noch immer in den Blättern zu finden.

In Pflanzen, die 200 kg N/ha über das Bodensubstrat erhalten hatten, fand eine stärkere Verlagerung des $^{15}NO_2$-N von den Blättern in die anderen Pflanzenfraktionen statt. Maispflanzen wiesen bei jeder Variante prozentual weniger $^{15}NO_2$-N in den Blättern und dafür mehr in der Sproßachse und den Wurzeln auf als Weizenpflanzen.

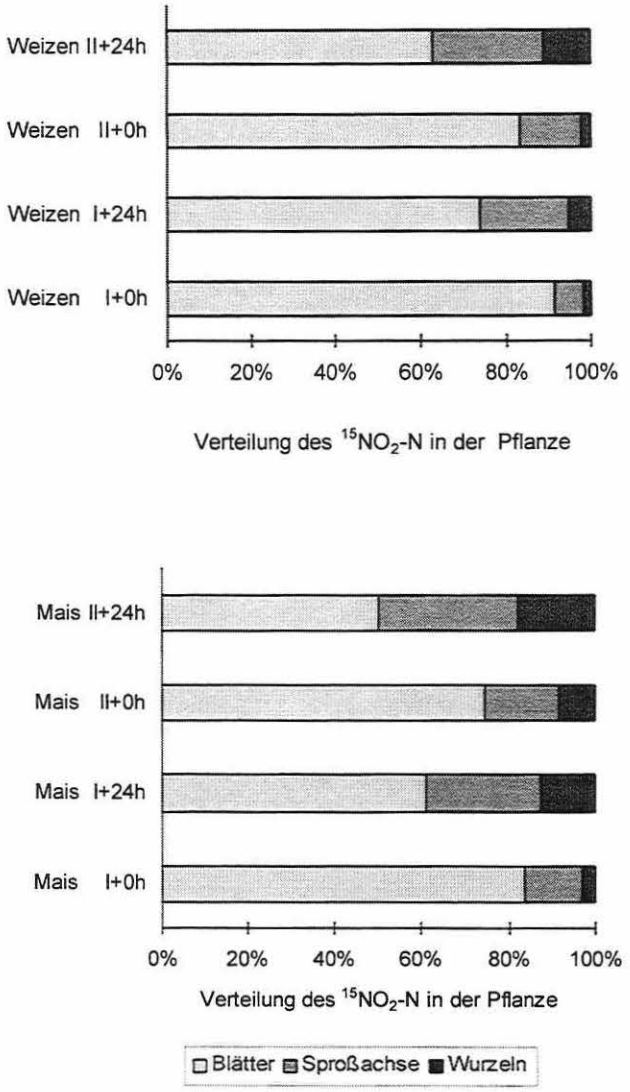

Abb. 3.20 Verteilung der ^{15}N-Exzeßmasse auf verschiedene Pflanzenfraktionen nach 8 h $^{15}NO_2$-Exposition (25 ppb) in Abhängigkeit von der Nitrat-Düngung (I: 50 kg Nitrat-N/ha II: 200 kg Nitrat-N/ha) und dem Erntezeitpunkt (0 h bzw. 24 h nach Beendigung der $^{15}NO_2$-Exposition) (n=4)

3.2.4. Vergleich der ^{15}N-Exzeßhäufigkeiten in unterschiedlichen N-Fraktionen

Der Gesamtstickstoff aus Blättern bzw. Stengeln wurde in die Fraktionen Strukturprotein-N, löslicher Protein-N und löslicher Nichtprotein-N aufgegetrennt. In den Abbildungen 3.21 und 3.22 sind die ^{15}N-Exzeßhäufigkeiten dargestellt.

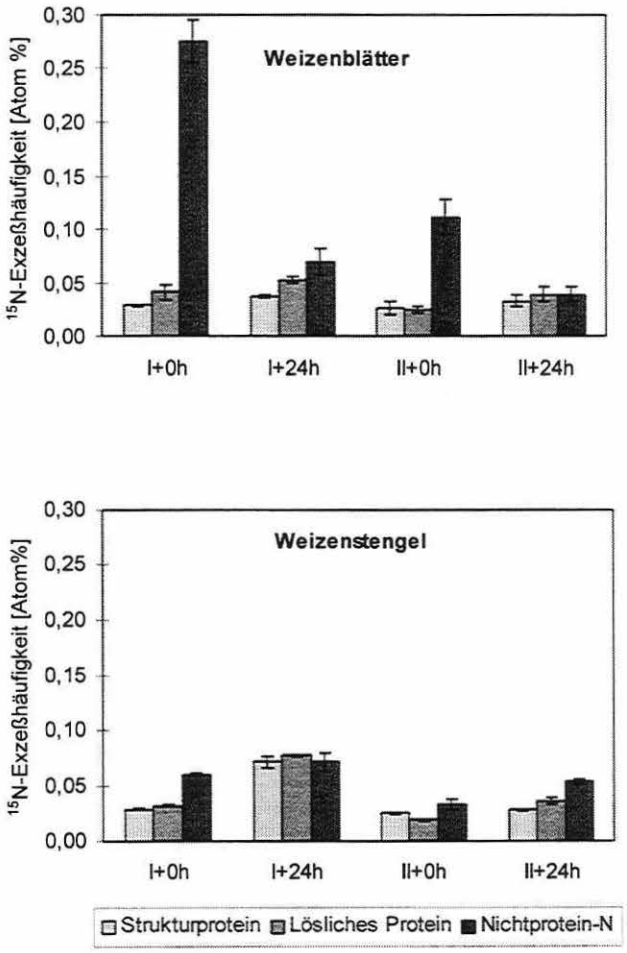

Abb. 3.21 ^{15}N-Exzeßhäufigkeiten in N-Fraktionen von Weizenblättern bzw. -stengeln nach 8 h $^{15}NO_2$-Exposition (10,25 Atom%) in Abhängigkeit vom Nitratangebot im Bodensubstrat (I: 50 kg Nitrat-N/ha II: 200 kg Nitrat-N/ha) und dem Erntezeitpunkt (0 h bzw. 24 h nach Beendigung der $^{15}NO_2$-Exposition) (n=4)

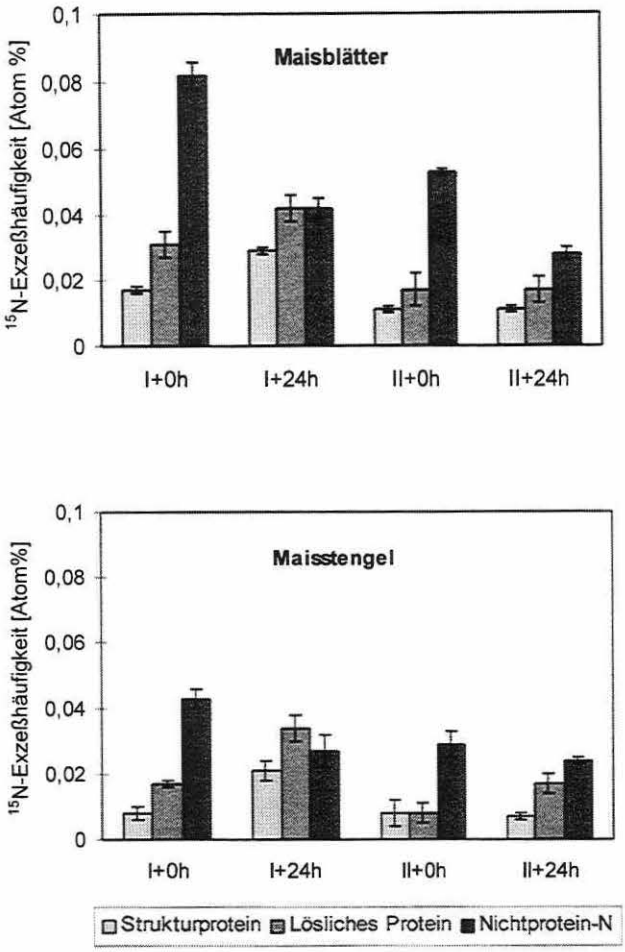

Abb. 3.22 ^{15}N-Exzeßhäufigkeiten in N-Fraktionen von Maisblättern bzw. -stengeln nach 8 h $^{15}NO_2$-Exposition (10,25 Atom%) in Abhängigkeit vom Nitratangebot im Bodensubstrat (I: 50 kg Nitrat-N/ha II: 200 kg Nitrat-N/ha) und dem Erntezeitpunkt (0 h bzw. 24 h nach Beendigung der $^{15}NO_2$-Exposition) (n=4)

Die höchste ^{15}N-Markierung wurde jeweils in der NPN-Fraktion der Blätter gefunden, die sofort nach Expositionsende geerntet worden waren. Zu diesem Zeitpunkt waren aber auch schon die Proteinfraktionen niedrig markiert. 24 h später war der ^{15}N-Gehalt im Struktur- und löslichem Protein etwas gestiegen, während er in der NPN-Fraktion erheblich gesunken war. Bei Weizenstengeln nahm die ^{15}N-Markierung in allen Fraktionen nach 24 h zu; dieser Effekt war allerdings bei den schwächer gedüngten Pflanzen ausgeprägter.

In Maisstengeln der Düngungsstufe I wurde nach 24 h ein Anstieg in den Proteinfraktionen und ein Abfall im Nichtprotein-N beobachtet. In den Maisstengeln der Düngungsvariante II konnten bis auf einen Anstieg im löslichen Protein keine Veränderungen beobachtet werden.

3.3. Ergebnisse der Ozonexposition

3.3.1. Enzymaktivitäten, Gehalt an löslichem Protein, Ammonium und Pigmenten

Die Auswirkungungen von O_3 auf die Aktivitäten N-assimilierender Enzyme sind in Tabelle 3.6 zusammengefaßt. Die zweiwöchige O_3-Begasung führte bei beiden Arten nur zu geringfügigen Änderungen der Enzymaktivitäten, welche aufgrund der hohen Standardabweichungen als nichtsignifikant betrachtet werden müssen. Die Nitratreduktase und Nitritreduktase ließen eine Tendenz zu verringerten Aktivitäten unter Ozonbelastung erkennen, wobei die Enzyme aus Maisblättern etwas deutlicher reagierten als die aus Weizen. Die Glutaminsynthetaseaktivität aus *Triticum*-Blättern war unter O_3-Exposition etwas erhöht. Die Abnahme der NR-Aktivität beim Mais war mit einem verminderten Pigmentgehalt in den Blättern, insbesondere Chlorophyll a und b, gekoppelt, während sich der Proteingehalt der ozonbehandelten Pflanzen gegenüber den Kontrollen nicht änderte (Tab. 3.6).
O_3-begaste Weizenpflanzen wiesen leicht erhöhte zelluläre Ammoniumkonzentrationen in den Blättern auf.

Tab. 3.6 Aktivitäten N-assimilierender Enzyme und Gehalte an löslichem Protein, Ammonium und Pigmenten in Blättern von Weizen und Mais unter Ozoneinfluß (n=4)

	Weizen		Mais	
	Kontrolle	**Ozon**	**Kontrolle**	**Ozon**
NADH-NR [pkat/g FM]	4,22 ± 0,67	3,67 ± 0,01	42,97 ± 5,18	31,98 ± 5,67
NiR [nkat/g FM]	9,14 ± 0,66	8,70 ± 0,81	6,31 ± 0,75	5,12 ± 0,07
GS [nkat/g FM]	38,48 ± 4,86	44,78 ± 2,21	8,81 ± 0,68	8,97 ± 0,67
NADH-GDH [nkat/g FM]	16,35 ± 1,33	15,88 ± 0,57	10,36 ± 1,27	9,00 ± 0,88
Lösliches Protein [mg/g FM]	6,37 ± 0,31	6,24 ± 0,80	10,70 ± 0,78	11,32 ± 0,67
Ammoniumgehalte [µmol/g FM]	0,73 ± 0,04	0,88 ± 0,02	0,94 ± 0,04	0,94 ± 0,02
Pigmentgehalte [µg/g FM]				
Chlorophyll a	552,0 ± 32,1	549,5 ± 43,9	590,5 ± 38,8	425,6 ± 58,6
Chlorophyll b	199,0 ± 21,6	193,1 ± 17,5	191,7 ± 13,9	139,7 ± 17,7
Carotinoide	167,1 ± 15,2	171,1 ± 8,9	229,2 ± 14,4	176,9 ± 24,2

3.3.2. Ergebnisse der ^{15}N-Tracerexperimente

Wie aus Abb. 3.23 zu ersehen ist, wurde der Einbau von $^{15}NO_3^-$ in die unterschiedlichen N-Fraktionen von Weizenblättern durch die Ozoneinwirkung nicht beeinflußt. Bei Blättern von *Zea mays* dagegen wurde unter Ozonbegasung ein deutlich verringerter Einbau des ^{15}N aus dem appliziertem $^{15}NO_3^-$ in allen untersuchten N-Fraktionen (Gesamtstickstoff, Strukturprotein, lösliches Protein und löslicher Stickstoff) gefunden.

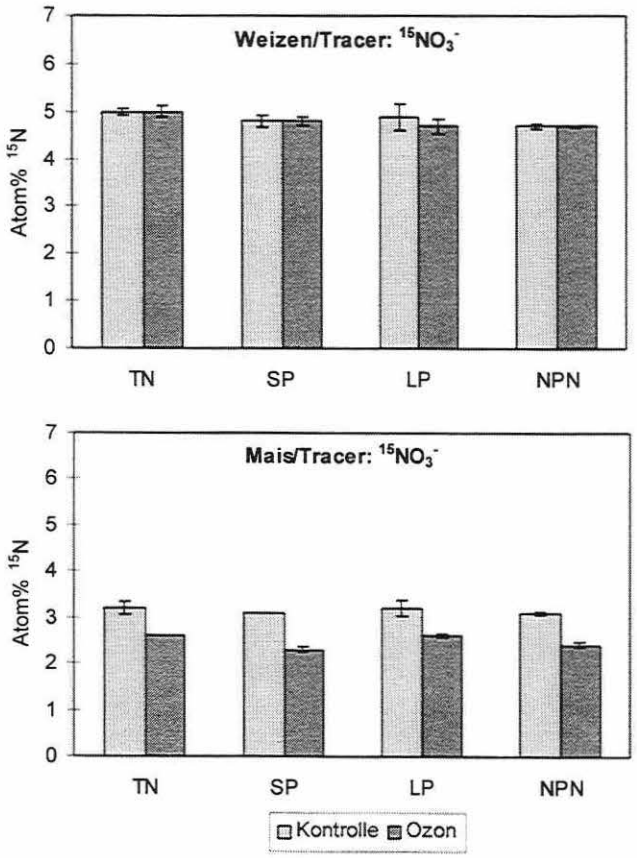

Abb. 3.23 Einfluß von Ozon auf den Einbau von $^{15}NO_3^-$ in N-Fraktionen von Weizen- und Maisblättern (TN: Total N, SP: Strukturprotein, LP: lösliches Protein, NPN: Nichtprotein-N) (n=4)

Bei Gabe von $^{15}NH_4^+$ wurden in den Blättern beider Arten unter Ozoneinwirkung erhöhte Einbauraten in allen N-Fraktionen festgestellt (Abb. 3.24). Beim Weizen ist dieser Ozoneffekt in der Fraktion der Strukturproteine deutlich stärker als in den Fraktionen der löslichen Proteine und des löslichen Stickstoffs; beim Mais ist er in allen Fraktionen vergleichbar.

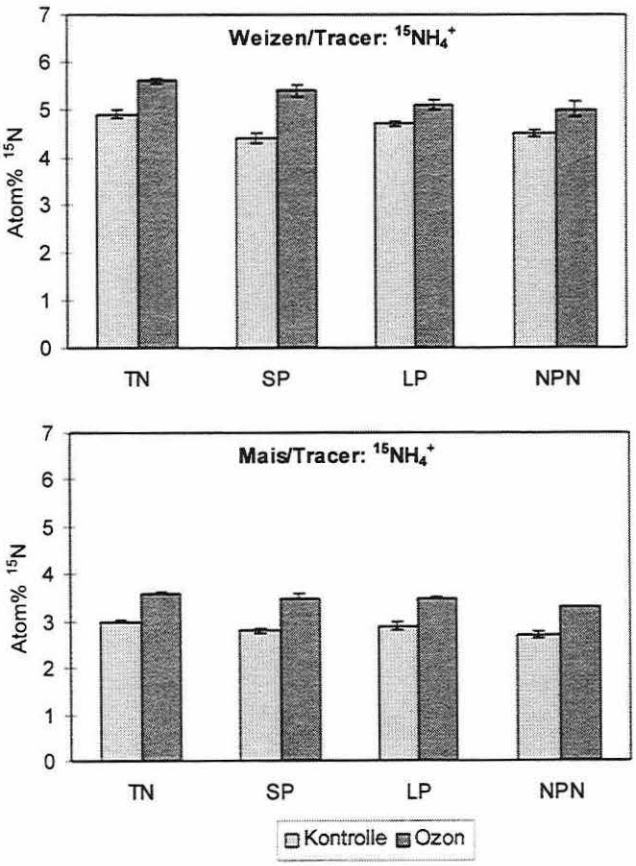

Abb. 3.24 Einfluß von Ozon auf den Einbau von $^{15}NH_4^+$ in N-Fraktionen von Weizen- und Maisblättern (TN: Total N, SP: Strukturprotein, LP: lösliches Protein, NPN: Nichtprotein-N) (n=4)

4. Diskussion

Da die atmosphärische O_3- und NO_x-Belastung infolge anthropogener Einflüsse unverändert hoch ist, ist in den letzten Jahren das wissenschaftliche Interesse an den ökotoxikologischen Wirkungen dieser Schadgase auf die Vegetation stetig gewachsen.

In zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die als trockene oder nasse Deposition in Ökosysteme eingetragenen Schadgase von pflanzlichen Organismen aufgenommen und metabolisiert werden können (Darrall 1989, Wellburn 1990, Elstner & Hippeli 1995). Als Eintrittspforte für gasförmige Schadstoffe gelten dabei die Spaltöffnungen der Blätter. Nasse Depositionen, die auf den Boden gelangen, werden über die Wurzeln aufgenommen.

Der pflanzliche Stoffwechsel reagiert auf diese Stressoren mit speziellen Adaptationsmechanismen (Schutz-, Reparatur-, Detoxifikationsreaktionen), um die Belastung zu beseitigen oder zu mindern (Schlee 1991, Bohnert et al. 1995, Iqbal et al. 1996, Fuhrer 1996). Wird aufgrund der Expositionskonzentration und -dauer die Kapazität dieser Mechanismen jedoch überschritten, können Wachstumsstörungen, Ertragseinbußen (Kulturpflanzen) und sichtbare Schadsymptome (Chlorosen, Nekrosen) auftreten. Die Wirkung von Schadgasen ist aber auch maßgeblich von den jeweiligen Klimafaktoren und von der Pflanzenspezies abhängig.

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichende Untersuchungen zum Einfluß von Ozon- und Stickstoffdioxidbelastungen auf den N-Metabolismus von Pflanzen durchgeführt, die unterschiedliche Photosynthesetypen repräsentieren (C_3-Pflanze Weizen, C_4-Pflanze Mais).

Diese Photosynthesetypen unterscheiden sich aufgrund ihrer spezifischen anatomischen und physiologischen Merkmale (vgl. 1.3), welche bedeutsam für die Reaktion auf Luftschadstoffe sein könnten.

Mittels ^{15}N-isotopentechnischer und enzymatischer Methoden sollten die Wirkungen von umweltrelevanten Nitrat-, Ammonium-, NO_2- und Ozonkonzentrationen auf den pflanzlichen Stoffwechsel untersucht und Aussagen hinsichtlich kausaler Zusammenhänge zwischen Photosynthesetyp bzw. Pflanzenart und der Sensitivtät gegenüber Schadgasen abgeleitet werden.

4.1. Düngungsexperimente über das Bodensubstrat

Ammoniak und NO_x können als nasse Depositionen auf den Boden gelangen, wo sie dann als NH_4^+ bzw. NO_3^- für die Pflanzen verfügbar sind (Wellburn 1990, Hadwiger-Fangmeier et al. 1992). Nach der Aufnahme durch die Wurzeln erfolgt die Metabolisierung zunächst über die Nitratreduktase/Nitritreduktase (Nitrat) bzw. die Glutaminsynthetase/Glutamatsynthase (Ammonium) (Lam et al. 1996). Da diese atmosphärischen N-Einträge in den Boden beträchtlichen Umfang erreichen können, stellt sich die Frage, inwieweit Pflanzen durch ein Stickstoffüberangebot beeinflußt werden.
Um Aussagen bezüglich dieser Problemstellung treffen zu können, wurden Weizen- und Maispflanzen unter kontrollierten Bedingungen definierte Stickstoffmengen (0-200 kg N/ha) in Form von KNO_3, $(NH_4)_2SO_4$ oder NH_4NO_3 appliziert und die Stickstoffaufnahme, die Aktivitäten der Schlüsselenzyme des N-Metabolismus, die zellulären Konzentrationen von N-Metaboliten sowie verschiedene Vitalitätsparameter untersucht. Die Angabe in kg N/ha wurde gewählt, um den Vergleich mit Freilanddaten zu erleichtern.

Wie man den Abb. 3.1-3.3 entnehmen kann, stiegen Biomasse, Pigmentgehalte und die Gehalte an löslichem Protein bei Weizen und Mais in Abhängigkeit vom Stickstoffangebot im Bodensubstrat an. Auch die Pflanzen der höchsten Düngungsstufe machten einen unbeeinträchtigten und vitalen Eindruck. Daher kann davon ausgegangen werden, daß die Versuchspflanzen dem N-Streß erfolgreich durch Adaptationsmechanismen begegnen konnten.
Der Biomassezuwachs infolge erhöhter N-Gaben war bei Nitratdüngung stärker ausgeprägt. Die meisten Pflanzen (Salsac et al. 1987, Pilbeam & Kirkby 1992, Raab & Terry 1994), insbesondere aber schnellwachsende, einjährige Arten (Cruz et al. 1993), bevorzugen Nitrat, was durch ein stärkeres Pflanzenwachstum und ein besser entwickeltes Wurzelsystem zum Ausdruck kommt. Als Ursachen für das verminderte Wachstum auf Ammonium als alleiniger Stickstoffquelle werden pH-Effekte (Azidifizierung des Wurzelraumes), Ammoniumakkumulation in der Zelle sowie Kationenimbalancen diskutiert (Pilbeam & Kirkby 1992).

In Tabelle 3.1 wurden die Sproß/Wurzel-Verhältnisse für Weizen und Mais aufgeführt, da diese ebenfalls aussagekräftige Hinweise zum Ernährungszustand der Pflanzen geben. Eine Pflanze, die unter Stickstoffmangel leidet, investiert stärker in die Entwicklung der Wurzeln, um die verfügbaren Nährstoffe besonders effizient aufnehmen zu können. Ausreichend ernährte Pflanzen hingegen bilden relativ viel oberirdische photosynthetisch aktive Masse, um

genügend C-Körper für die Metabolisierung des aufgenommenen Stickstoffs bereitstellen zu können (Khamis & Lamaze 1990, Rufty et al. 1990, Scheible et al. 1997, Saarinen 1998, Andrews et al. 1999).

Das Sproß/Wurzel-Verhältnis nahm bei den untersuchten Pflanzen generell mit der applizierten N-Menge zu, wobei Nitratpflanzen dabei jedoch höhere Quotienten aufwiesen als ammoniumgedüngte Pflanzen. Dieser Effekt, der bei Weizen sehr deutlich und bei Mais eher geringfügig ausgeprägt war, beruhte auf vergleichsweise geringerem Sproßwachstum der Ammoniumpflanzen.

Betrachtet man den N-Stoffwechsel, so wird anhand der Stickstoffgehalte (Abb. 3.12) und der ^{15}N-Exzeßwerte (Abb. 3.14), welche ein Maß für die Nitrat- bzw. Ammoniumaufnahme darstellen, deutlich, daß die N-Aufnahme mit dem Stickstoffangebot im Bodensubstrat anstieg. Weizenpflanzen nahmen unabhängig von der applizierten N-Form mehr Stickstoff pro g Trockenmasse auf als Maispflanzen. Wie aus Abb. 3.13 deutlich wird, investierten Weizenpflanzen diesen Stickstoff verstärkt in die Blattfraktion.

Unter der Bedingung, daß den Pflanzen entweder $^{15}NH_4^+$ oder $^{15}NO_3^-$ als alleinige Stickstoffform zur Verfügung stand, waren bei Mais lediglich geringe Unterschiede im Aufnahmeverhalten für Ammonium oder Nitrat festzustellen (Abb. 3.14). Weizenpflanzen hingegen zeigten bei N-Gaben über 25 kg N/ha deutlich höhere Aufnahmeraten für Ammonium. Dieses Verhalten wird möglicherweise durch Unterschiede in den Aufnahmemechanismen für Nitrat und Ammonium verursacht. Während Nitrationen in einem energieabhängigen Prozeß entgegen dem elektrochemischen Potentialgradienten in die Wurzelzelle transportiert werden, erfolgt die Ammoniumaufnahme mit dem elektrochemischen Potentialgradienten energetisch günstiger (Salsac et al. 1987, Ullrich 1992, Tischner 1994, Frommer et al. 1994). Da das Nitrattransportsystem durch Feedbackregulation beeinflußt wird, ist die NO_3^--Aufnahmerate auch vom N-Status der Pflanze abhängig (Imsande & Touraine 1994, Padgett & Leonard 1996, Ivashikina & Sokolov 1997).

Da unter Freilandbedingungen kaum damit zu rechnen ist, daß den Pflanzen ausschließlich Ammonium oder Nitrat als N-Quelle zur Verfügung steht, wurden ergänzende Tracerexperimente mit $NH_4{}^{15}NO_3$ durchgeführt. Wie aus den Abbildungen 3.14 und 3.15 zu erkennen ist, stagnierte die Nitrat-Aufnahme aus Ammoniumnitrat ab einer Düngergabe von 50 kg N/ha (entspricht 25 kg NO_3^--N/ha). Insbesondere für Weizen konnte gezeigt werden, daß die Nitrataufnahme durch die gleichzeitige Anwesenheit von NH_4^+ erniedrigt wurde. Dieser Effekt

trat um so stärker in Erscheinung, je höher die Ammoniumnitratgabe (und damit die Ammoniumkonzentration) war. Bei Mais hingegen war nur eine leichte Verminderung der Nitrataufnahme in Anwesenheit von Ammonium festzustellen.

Die Hemmung der Nitrataufnahme durch Ammoniumionen im Bodensubstrat wurde wiederholt beschrieben (Pilbeam & Kirkby 1992, Jackson & Volk 1995, Colmer & Bloom 1998, Kronzucker et al. 1999). Der Mechanismus der Inhibierung ist bislang jedoch noch umstritten; es existieren verschiedene Hypothesen, welche entweder die Hemmung des Nitrattransportsystems oder der Nitratassimilation (Nitratreduktase) durch Feedback-Inhibierung in Betracht ziehen (de la Haba et al. 1990, King et al. 1993, Aslam et al. 1996).

Die gesteigerte Stickstoffinkorporation spiegelte sich auch in den *in vitro*-Aktivitäten der untersuchten Enzyme des N-Metabolismus wider (Abb. 3.4-3.9). Sowohl die Aktivitäten der Nitratreduktase als auch der Nitritreduktase aus den Blättern beider Spezies stiegen infolge steigender Nitratkonzentrationen im Boden an. Ammoniumernährte Pflanzen wiesen nur sehr geringe NR- und NiR-Aktivitäten auf.

Bei der Bestimmung der Glutaminsynthetase-Aktivitäten wurden in Weizenblättern weitaus höhere Werte gefunden als in Maisblättern (Abb. 3.6). Die höhere GS-Kapazität bei der C_3-Spezies Weizen ist wohl mit der Notwendigkeit der schnellen Detoxifikation des aus der Photorespiration stammenden Ammoniums zu erklären (Kumar et al. 1993). In Blättern der C_3-Pflanzen kann das photorespiratorisch erzeugte Ammonium das 20fache des bei der Nitratassimilation anfallenden NH_4^+ betragen (Canvin 1990).

Während die Glutaminsynthetase aus den Blättern beider Pflanzen gleichermaßen auf Nitrat und Ammonium reagierte, waren bei der GS aus den Wurzeln folgende Ergebnisse zu beobachten (Abb. 3.7): In Weizenwurzeln zeigte sich ein starker Anstieg der Enzymaktivität unter Ammoniumeinfluß, in Maiswurzeln wurde dieser Effekt unter Nitrateinfluß gefunden. Dieses Verhalten deutet auf Unterschiede in der Lokalisierung der Nitrat- bzw. Ammoniumassimilation hin.

Die Funktion der GDH im pflanzlichen Stoffwechsel ist noch immer umstritten (Oaks 1995, Fox et al. 1995, Pahlich 1996, Oliveira et al. 1997). Einige Autoren schreiben der GDH eine rein katabole Funktion insbesondere während der Keimung, Seneszenz und unter C-Mangel zu (Robinson et al. 1991, Robinson et al. 1992, Lea et al. 1992), andere jedoch diskutieren eine ammoniumdetoxifizierende Funktion der GDH unter bestimmten Bedingungen (Ammoniumstreß in der Zelle) (Cammaerts & Jacobs 1985, Magalhães 1990, Shargool et al. 1991, Melo-Oliveira et al. 1996). Diese letztere Hypothese wird durch die hier vorliegenden Ergeb-

nisse unterstützt, da steigende Ammoniumgaben zu erhöhten NADH-Glutamatdehydrogenase-Aktivitäten in Blättern und Wurzeln führten, wobei dieser Effekt bei Weizenpflanzen deutlich ausgeprägter war (Abb. 3.8-3.9). Die Bestimmung der zellulären Ammoniumkonzentrationen ergab erhöhte Werte für Blätter und Wurzeln ammoniumgedüngter Weizenpflanzen (Abb. 3.10), so daß man tatsächlich von einer Streßsituation für die Pflanzen ausgehen kann. In Maisblättern war keine NH_4^+-Akkumulation festzustellen, auch in den Wurzeln zeigten sich ausschließlich bei der höchsten Düngungsstufe erhöhte Werte. Diese Ergebnisse stellen ein Indiz für eine größere Sensitivität von Weizenpflanzen gegenüber hohen Ammoniumkonzentrationen im Boden dar. Die C_4-Pflanze Mais hingegen scheint einen relativ großen Toleranzbereich gegenüber Ammoniumeinträgen in den Boden aufzuweisen. Dieser ökologische Vorteil könnte mit einer geringeren Belastung durch endogen gebildetes Ammonium infolge fehlender bzw. sehr geringer Photorespiration erklärt werden.

Hinsichtlich der prozentualen Verteilung des aufgenommenen Tracers auf die untersuchten Pflanzenfraktionen (Blätter, Sproßachse, Wurzeln) wurde bei Weizen ein vergleichsweise höherer Anteil des ^{15}N in den Blättern gefunden als bei Mais (Abb. 3.16, 3.17). Das ist wohl auf die Notwendigkeit zurückzuführen, relativ viel N in die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase zu investieren, welche bei den C_3-Pflanzen den primären Schritt der CO_2-Fixierung katalysiert. C_4-Pflanzen verfügen über ein ökonomischeres und effektiveres System der CO_2-Fixierung, das ihnen maximale Wachstumsraten bereits bei Blattstickstoffkonzentrationen von 3-5% der Trockenmasse ermöglicht, während C_3-Pflanzen 6-7% Stickstoff in den Blättern aufweisen müssen (Greenwood 1976).

Die ersten stabilen organischen Produkte der Stickstoffassimilation sind Aminosäuren und Amide (Oaks 1994b). Sie stellen die Bausteine der Proteine dar und können als N-Speicherform in der Zelle fungieren (Nordin & Näsholm 1997); weiterhin kommt ihnen eine regulatorische Funktion in vielen mit dem Stickstoffmetabolismus verbundenen Prozessen zu (Barneix & Causin 1996).

Der zelluläre Gehalt an freien Aminosäuren wird in starkem Maße durch die Quantität und Qualität der Stickstoffversorgung der Pflanzen beeinflußt (Ferrario et al. 1995, Nordin & Näsholm 1997). So steigt der totale Gehalt an freien Aminosäuren in vielen Pflanzen an, wenn das N-Angebot erhöht wird. Pflanzen, die auf Ammonium gewachsen sind, weisen dabei jedoch häufig höhere Konzentrationen an freien Aminosäuren auf als Pflanzen, die mit Nitrat gedüngt wurden (Causin & Barneix 1993). Näsholm & Ericsson (1990) wiesen darauf hin, daß die

Akkumulation freier Aminosäuren bevorzugt dann stattfindet, wenn das N-Angebot vergleichsweise höher ist als das Angebot anderer Nährstoffe.
Einzelne Aminosäuren können natürlich eine andere Tendenz aufweisen als der Gesamtgehalt an Aminosäuren (Sonntag & Mahn 1998).
Zahlreiche Untersuchungen an unterschiedlichen Pflanzenarten belegen, daß im Pool der freien Aminosäuren einige wenige, in ihrer Biosynthese eng zusammenhängende Aminosäuren dominieren (Lam et al. 1996, Huhn & Schulz 1996, Sonntag & Mahn 1998). Dazu zählen neben den Aminogruppendonatoren Glutaminsäure, Asparaginsäure und Alanin auch die Amide Glutamin und Asparagin sowie Prolin und Arginin. Da deutliche Reaktionen auf das N-Regime ebenfalls vorrangig bei diesen dominierenden Aminosäuren gefunden werden, erschien es sinnvoll, die quantitative Analyse auf diese zu konzentrieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Gehalte an ausgewählen freien Aminosäuren in Weizen- und Maispflanzen bestimmt, die mit Nitrat oder Ammonium (50 und 200 kg N/ha) gedüngt worden waren (Tab. 3.2-3.3).
Die Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren wurden durch die Art und Menge des applizierten N-Düngers beeinflußt. Besonders auffällig war dabei die Entwicklung der Asparagingehalte sowohl bei Weizen- als auch bei Maispflanzen: In ammoniumgedüngten Pflanzen zeigte sich Asparagin als absolut dominierend im Pool der analysierten freien Aminosäuren. Bei Erhöhung der Ammoniumapplikation stiegen die Asn-Gehalte sprunghaft an. Nitratpflanzen hingegen wiesen zwar auch einen Anstieg der Asn-Konzentration in Abhängigkeit von der Nitratdosis auf; die Asparagingehalte lagen jedoch weitaus niedriger als im Fall der ammoniumgedüngten Pflanzen.
Die Tendenz der Glutamingehalte verlief gleichsinnig, wenn auch weitaus weniger drastisch.

Da die Amide Asparagin und Glutamin als N-Speicher- und Transportformen im pflanzlichen Stoffwechsel gelten (Rowland et al. 1988, Sonntag & Mahn 1998), weist die beobachtete starke Asn-Akkumulation darauf hin, daß in ammoniumgedüngten Weizen- und Maispflanzen ein hoher Bedarf für die temporäre N-Speicherung/Ammoniumentgiftung besteht. In diesem Fall führte das gesteigerte Ammoniumangebot offenbar nicht zu einer sofortigen adäquaten Steigerung der Proteinbiosynthese, was auf einem Engpaß in der Zulieferung der notwendigen C-Körper beruhen könnte. In einer solchen Situation eignen sich insbesondere Aminosäuren mit einem hohen N/C-Verhältnis wie Asparagin, Glutamin oder Arginin als N-Speicherformen. Daß die Kulturpflanzen Weizen und Mais Asn als Stickstoffspeicher bevorzugen, steht in

Übereinstimmung mit Literaturangaben (Cramer et al. 1993). Der Effekt der Asparaginakkumulation war in ammoniumgedüngten Maispflanzen etwas schwächer ausgeprägt als in den adäquat angezogenen Weizenpflanzen. Dieses beruht wahrscheinlich auf einer besseren Verfügbarkeit von C-Körpern, die auf die höhere Effizienz des C-Stoffwechsels der C_4-Art zurückgeführt werden kann.

Arginin, welches das höchste N/C-Verhältnis aufweist, gilt als Indikator für N-Streß bei Koniferen (Edfast et al. 1990, Ericsson et al. 1993). Der Argininggehalt war im Vergleich zu den anderen untersuchten Aminosäuren als gering einzuschätzen.

Auch Alanin und Serin wurden in den Blättern (Weizen) bzw. in der gesamten Pflanze (Mais) bei entsprechend hoher Ammoniumversorgung verstärkt gefunden. In Blättern von nitratgedüngten Weizenpflanzen wurden erhöhte Glutamatwerte gemessen, während die Glutamat- und Aspartatkonzentrationen in Mais bei beiden N-Regimes vergleichbar waren.

Das als Indikator für osmotischen sowie oxidativen Streß geltende Prolin (Chiang & Dandekar 1995, Polle 1997, Borsani et al. 1999, Hare et al. 1999) spielte im Pool der freien Aminosäuren in Weizen und Mais nur eine untergeordnete Rolle.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die N-Aufnahme und Biomasseproduktion in Abhängigkeit vom Stickstoffangebot im Bodensubstrat anstiegen. Dabei wiesen junge Weizenpflanzen generell eine höhere N-Aufnahme (bezogen auf die Biomasse) auf als Maispflanzen.

Grundsätzlich wirkte sich Nitratdüngung bei beiden Arten günstiger auf die Biomasseproduktion aus als Ammoniumdüngung, wobei dieser Effekt bei Weizenpflanzen deutlich stärker in Erscheinung trat.

Die Resultate der Ammoniumbestimmung in den Pflanzen zeigten, daß in der C_3-Pflanze Weizen schneller toxische zelluläre Ammoniumkonzentrationen auftreten können. Das läßt sich dadurch erklären, daß in C_3-Pflanzen durch Photorespiration Ammonium in der Zelle freigesetzt wird, wodurch ein Teil der Entgiftungskapazitäten bereits gebunden wird. Demnach sind C_3-Pflanzen insbesondere bei hohen Ammoniumeinträgen stärker von negativen NH_4^+-Effekten bedroht als C_4-Pflanzen.

Gesteigerte Ammoniumgaben führten insbesondere bei Weizen zu einer drastischen Erhöhung der zellulären Konzentrationen freier Aminosäuren mit hohem N/C-Verhältnis; bei Mais fiel dieser Effekt schwächer aus. Dies verdeutlicht, daß bei einem Überangebot an Ammonium die Notwendigkeit einer temporären N-Speicherung besteht, um toxische NH_4^+-Konzentrationen in der Pflanze zu vermeiden.

Aus diesen Ergebnissen ist das Fazit zu ziehen, daß Nitrat als N-Quelle das Wachstum der untersuchten Pflanzen generell günstiger beeinflußt als Ammonium. Die C_4-Pflanze Mais kann Ammoniumdüngung zwar besser tolerieren als Weizen; dieser höheren Belastbarkeit sind allerdings auch Grenzen gesetzt.

4.2. $^{15}NO_2$-Exposition

Seitdem verschiedene Autoren in den 70er Jahren nachgewiesen haben, daß Pflanzen in der Lage sind, Stickoxide aus der Luft über den Sproß aufzunehmen und in ihre Biomasse einzubauen (Durmishidze & Nutsubidze 1976, Yoneyama et al. 1979, Rogers et al. 1979), beschäftigen sich zahlreiche Arbeiten mit der Fragestellung, inwieweit Stickoxide einen förderlichen bzw. schädigenden Einfluß auf den pflanzlichen Organismus ausüben (Wellburn 1990, Segschneider 1995).
In der Vergangenheit wurden die Pflanzen dabei vielfach unrealistisch hohen NO_2-Expositionskonzentrationen von 0,5-4 ppm NO_2 ausgesetzt, wobei sich die NO_2-Konzentrationen in der Atmosphäre lediglich im Bereich von 3-40 ppb bewegen (Oehmichen 1986).
Daher stellt sich nun die Aufgabe, die pflanzliche Reaktion auf umweltrelevante NO_2-Konzentrationen zu untersuchen und dabei artspezifische Unterschiede zu analysieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden 14 Tage alte Weizen- und Maispflanzen unter den beschriebenen Bedingungen (siehe 2.1.2.) 8 h mit 25 bzw. 50 ppb $^{15}NO_2$ (10 Atom%) exponiert. Die in den Pflanzen gefundenen ^{15}N-Exzeßmengen wurden als Maß für die $^{15}NO_2$-Aufnahme genutzt.
Es konnte gezeigt werden, daß die Pflanzen, die über das Bodensubstrat mit ausreichenden Nitratgaben (50 bzw. 200 kg NO_3^--N/ha) versorgt waren, $^{15}NO_2$ über den Sproß aufgenommen und assimiliert haben.
Die aufgenommene $^{15}NO_2$-Menge war von der Stickstoffdioxidkonzentration abhängig. Bei 50 ppb nahmen Weizen und Mais ca. doppelt so viel $^{15}NO_2$ auf wie bei 25 ppb (Abb. 3.18). Dies steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die einen linearen Zusammenhang zwischen der NO_2-Konzentration in der Atmosphäre und der NO_2-Aufnahme durch die Pflanze für diesen Konzentrationsbereich beschreiben (Latus 1989, Segschneider 1994, Weber & Rennenberg 1996, Thoene et al. 1997).
Die Nitratkonzentration im Bodensubstrat übte nur einen geringen Einfluß auf die $^{15}NO_2$-Aufnahme aus. Das könnte damit erklärt werden, daß beide Varianten (50 bzw. 200 kg N/ha) eine ausreichende N-Versorgung sicherstellten; bei Exponierung einer N-Mangel-Pflanze ist

möglicherweise eine höhere NO_2-Aufnahmerate wahrscheinlich. Da das Anliegen dieser Arbeit jedoch darin bestand, die heute vorherrschenden Stickstoffüberdüngungseffekte zu untersuchen, wurde auf eine N-Mangel-Variante verzichtet.

Da die Blattfläche einen entscheidenden Faktor für die Gasaufnahme durch die Pflanze darstellt, wurde die $^{15}NO_2$-Aufnahme in Bezug zur Blattfläche gesetzt, um das Aufnahmeverhalten der beiden morphologisch doch recht unterschiedlichen Pflanzen vergleichen zu können (Abb. 3.19). Dabei wurde deutlich, daß Weizenpflanzen pro cm^2 Blattfläche ungefähr die doppelte Menge an $^{15}NO_2$ aufgenommen haben.
Ähnliche Ergebnisse erhielt Segschneider (1994) beim Vergleich der NO_2-Aufnahme von Sonnenblumen und Maispflanzen, wobei für Sonnenblumen eine ca. sechsfache Aufnahmerate gefunden wurde. Beträchtliche Unterschiede in der Fähigkeit verschiedener Pflanzenarten, NO_2 aus der Atmosphäre aufzunehmen und zu assimilieren, wurden von Morikawa et al. (1998) beschrieben.

Als entscheidender Faktor für die NO_2-Aufnahme wird das Öffnungsverhalten der Stomata (WHO 1997, Robinson et al. 1998) diskutiert, da höhere Pflanzen Stickstoffdioxid fast ausschließlich über die Spaltöffnungen der Blätter aufnehmen (Hanson & Lindberg 1991, Duyzer & Fowler 1994) und der interne Widerstand gegenüber NO_2 sehr gering ist. Da C_4-Pflanzen aufgrund ihrer effektiveren CO_2-Assimilation und des daraus resultierenderen geringeren CO_2-Bedarfs ihre Stomata weniger weit öffnen müssen als C_3-Pflanzen, könnte erwartet werden, daß C_3-Pflanzen gasförmige Schadstoffe in stärkerem Maße aufnehmen als C_4-Pflanzen. Diese Hypothese wird durch die experimentell erhaltenen Ergebnisse unterstützt.

Der aufgenommene $^{15}NO_2$-N war bei Weizen und Mais in allen Pflanzenfraktionen (Blätter, Sproßachse, Wurzeln) bereits nach 8 h Exposition und nachfolgender sofortiger Ernte nachweisbar. Der überwiegende Anteil des aufgenommenen $^{15}NO_2$-N befand sich zu diesem Zeitpunkt bei beiden Arten in der Blattfraktion, wobei in Maispflanzen schon eine vergleichsweise stärkere Verlagerung des ^{15}N in Sproßachse und Wurzeln festgestellt wurde (Weizenblätter I [50 kg N/ha]: 91,4%, II [200 kg N/ha]: 83,2 %; Maisblätter I [50 kg N/ha]: 83,8%, II [200 kg N/ha]: 74,6 %). Auch die über das Bodensubstrat applizierte Nitratmenge beeinflußte diesen Prozeß; in den schwächer gedüngten Pflanzen (50 kg N/ha) wurde der $^{15}NO_2$-Stickstoff nicht in so starkem Maße aus den Blättern abtransportiert wie im Falle der 200 kgN/ha-Varianten.

24 h nach Expositionsende war der Translokationsprozeß des markierten Stickstoffs noch weiter fortgeschritten; die Blätter enthielten aber noch immer den überwiegenden Anteil (Weizenblätter I [50 kg N/ha]: 73,8%, II [200 kg N/ha]: 63,0 %; Maisblätter I [50 kg N/ha]: 61,0%, II [200 kg N/ha]: 50,5 %).

Dies bestätigt die Literaturangaben, denen zufolge die Blätter nicht nur das Aufnahmeorgan, sondern auch die bevorzugte Senke für NO_2-N darstellen (Kaji et al. 1980, Yoneyama et al. 1980a, Latus 1989, Segschneider 1994). Allerdings kann ein Teil des NO_2 auch über die unverholzten Stengel der jungen Pflanzen aufgenommen und von dort weitertransportiert werden.

Die Unterschiede zwischen Weizen und Mais bezüglich der Translokation des $^{15}NO_2$-N könnten mit einem unterschiedlich großem N-Bedarf in Blättern von C_3- und C_4-Pflanzen erklärt werden. C_3-Arten müssen höhere Blattstickstoffgehalte aufweisen, um maximale Wachstumsraten zu erreichen; daher verblieb bei Weizen offenbar ein größerer Anteil des $^{15}NO_2$-Stickstoffs in der Blattfraktion.

Um Aussagen zur Metabolisierung des $^{15}NO_2$-N treffen zu können, wurde die ^{15}N-Häufigkeit in verschiedenen N-Fraktionen der Pflanzen bestimmt.

Kurz nach Beendigung der Exposition wurde die höchste ^{15}N-Markierung in der Nichtproteinfraktion in Blättern und Stengeln gefunden. Zu diesem Zeitpunkt konnte aber auch schon im Protein $^{15}NO_2$-N nachgewiesen werden. 24 h später hatte die ^{15}N-Häufigkeit in der Nichtproteinfraktion merklich abgenommen, im löslichen und Strukturprotein dagegen hatte sie sich erhöht. Dies zeigte, daß der Einbau des $^{15}NO_2$-N sehr rasch erfolgt ist, was sicherlich auch mit dem frühen Entwicklungsstadium und der damit verbundenen hohen Stoffwechselaktivität der untersuchten Pflanzen zu erklären ist.

Bislang herrscht noch keine Klarheit darüber, wie der NO_2-N in den pflanzlichen Stickstoffkreislauf eingebaut wird. Es wird davon ausgegangen, daß NO_2 beim Übergang vom substomatären Raum in das apoplastische Zellwasser folgende Reaktion mit Wasser eingeht (Lee & Schwartz 1981, Lea et al. 1994):

$$2NO_{2(gas)} + H_2O \longrightarrow 2H^+ + NO_3^- + NO_2^-$$

Das hierbei gebildete Nitrat bzw. Nitrit könnte über die Nitratreduktase/Nitritreduktase-Route in den N-Stoffwechsel der Pflanze eingehen (Wellburn 1990, Stulen & Ter Stege 1995).

Nach Lee & Schwartz (1981) und Ramge et al. (1993) ist die Lösungsreaktion des NO_2 mit Wasser allerdings um ein bis zwei Größenordnungen zu langsam, um die beobachteten Depositionsgeschwindigkeiten für NO_2 bei niedrigen NO_2-Partialdrücken zu erklären.
Alternativ wird eine direkte biochemische Reaktion des NO_2 mit Ascorbat unter Bildung von Nitrit (Forni et al. 1986, Ramge et al. 1993) oder die direkte Kopplung der NO_2-Aufnahme an ein spezifisches Reduktasesystem (Kaji et al. 1980) vermutet.

Die Hypothese vom Einbau des NO_2-N über die Nitratreduktase wird allerdings durch die Beobachtung unterstützt, daß durch NO_2-Einwirkung in vielen Pflanzen eine Induktion der Nitratreduktase erfolgt (Zeevaart 1976, Wingsle et al. 1987, Srivastava & Ormrod 1989, Bender et al. 1991, von Ballmoos et al. 1993, Fomin & Sallenave 1996, Hufton et al. 1996, von Ballmoos et al. 1998).
Expositionsexperimente mit $^{15}NO_2$ resultierten zunächst in einer ^{15}N-Anreicherung in den Aminosäuren Glutamin und Glutamat, was ebenfalls für den Einbaupfad über NR/NiR und nachfolgend den Glutamat-Glutamin-Zyklus spricht (Ito et al. 1986, Weber et al. 1995).
Um Aussagen über die Wirkung von NO_2 auf biochemischer Ebene treffen zu können, wurden die *in vitro* Aktivitäten stickstoffassimilierender Enzyme (NADH-Nitratreduktase, Nitritreduktase, Glutaminsynthetase, NADH-Glutamatdehydrogenase) in Blättern von Weizen und Mais im Vergleich zu Kontrollpflanzen bestimmt.
Nach 8 h Exposition mit 25 ppb $^{15}NO_2$ konnte bei Weizen und Mais keine Beeinflussung der untersuchten Enzymaktivitäten festgestellt werden.
Das kann seine Ursache in der Gestaltung der Versuchsbedingungen haben; viele Autoren, die unter NO_2-Einfluß Aktivitätsveränderungen der Nitratreduktase, der Nitritreduktase (Yoneyama et al. 1979, Wellburn et al. 1980 und 1981, Fomin & Sallenave 1996), der Glutaminsynthetase (Tischner et al. 1988, Yu et al. 1988) bzw. der Glutamatdehydrogenase (Wellburn 1980 und 1981) beobachteten, haben mit weitaus höheren NO_2-Konzentrationen und/oder längeren Expositionszeiten gearbeitet. Es liegen auch kaum Untersuchungen mit Weizen oder Mais vor, wodurch ein direkter Vergleich erschwert wird, da auch mit artspezifischen Unterschieden in der Reaktion gerechnet werden muß. Für die Nitritreduktase aus *Zea mays* zumindest fanden Yoneyama et al. (1979) selbst bei einer NO_2-Konzentration von 4 ppm nur eine sehr geringe Aktivitätssteigerung.
Zudem dürften die N-assimilierenden Enzyme in beiden Pflanzen infolge des Nitratangebots im Bodensubstrat in ausreichendem Maße induziert worden sein, um auch den NO_2-N umsetzen zu können. Dafür spricht auch der Fakt, daß unter den gegebenen Bedingungen weder in

Weizen noch in Mais eine Nitritakkumulation nachgewiesen werden konnte, auf welche die phytotoxische Wirkung von NO_2 unter anderem zurückgeführt wird (Wellburn 1990).

Der Beitrag des NO_2 zur N-Ernährung von Weizen und Mais dürfte gering sein, wenn man berücksichtigt, daß es sich um landwirtschaftliche Nutzpflanzen handelt, die über den Boden ein hohes mineralisches Stickstoffangebot erhalten. Yoneyama et al. (1980b) schätzten, daß Kulturpflanzen bei ausreichendem N-Angebot unter Freilandbedingungen 1-3 % ihres N-Gehaltes durch NO_2-Aufnahme gewinnen. Allerdings ist in der Praxis auch die nasse Deposition von NO_2 auf dem Boden in Betracht zu ziehen.

Unter den gegebenen Bedingungen wurden keine Anzeichen für negative NO_2-Effekte (Nitritakkumulation) gefunden; allerdings müßte überprüft werden, ob eine Langzeitexposition bzw. NO_2-Einwirkung während der Dunkelphase Wirkungen auf das Pflanzenwachstum hervorruft.

4.3. Ozonexposition

Chronische O_3-Exposition führt bei landwirtschaftlichen Nutzpflanzen zu Wachstumsstörungen und Ertragsminderung (Heck et al. 1983, Fuhrer et al. 1989, Heagle et al. 1999, Grantz & Farrar 1999). Ein typischer Effekt der Ozonexposition ist vorzeitige Blattseneszenz (Miller et al. 1999), die äußerlich durch Chlorosen sichtbar wird; ebenso werden verminderte Protein- und Chlorophyllgehalte beschrieben.

Die von uns 14 Tage bei durchschnittlich 72 ppb exponierten Weizen- und Maispflanzen zeigten jedoch keine äußeren Anzeichen für Ozonstreß. Der Gehalt an löslichem Protein war bei beiden Arten unter Ozoneinfluß unverändert; bei Mais war allerdings ein verminderter Chlorophyllgehalt festzustellen. Das läßt vermuten, daß Mais unter den gegebenen Bedingungen stärker auf Ozon reagiert als Weizen.
Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse der $^{15}NO_3^-$-Tracerexperimente bestätigt. Während die Nitrataufnahme bei Weizen unbeeinflußt blieb, zeigten Maispflanzen unter O_3-Einwirkung deutlich verminderte $^{15}NO_3^-$-Aufnahme- und Einbauraten. Dieser Effekt könnte auf die verminderte Aktivität der NADH-Nitratreduktase in Maisblättern zurückzuführen sein. Eine inhibierende Wirkung von Ozon auf die Nitratreduktase wurde auch von Tingey et al. (1973) bei Soyabohnen, von Leffler & Cherry (1974) bei Mais und Soyabohnen, von Bender

et al. (1991) bei Bohnen und von Wellburn et al. (1996) bei Aleppokiefern beschrieben. Vollkommen ungeklärt ist aber bislang noch die Frage, ob O_3 einen direkten Einfluß auf das Enzym ausübt oder ob die reduzierte Nitratreduktase-Aktivität Folge einer ozonbedingten Schädigung des Photosyntheseapparates ist (Klumpp et al. 1989).

$^{15}NH_4^+$ wurde dagegen in Weizen und Mais unter Ozoneinfluß verstärkt in alle untersuchten N-Fraktionen eingebaut. Da Ammonium im Gegensatz zu Nitrat mit dem elektrochemischen Potentialgradienten aufgenommen und die energieaufwendige und infolge der Ozonbelastung beeinträchtigte Nitratreduktion übersprungen wird, kann davon ausgegangen werden, daß unter O_3-Streß und den damit einhergehenden Einschränkungen der Photosynthese die Ammoniumassimilation von energetischem Vorteil ist. Durch die verstärkte NH_4^+-Aufnahme kann auch der Stickstoffbedarf, der aufgrund des ozonbedingten gesteigerten Proteinturnovers zur Neusynthese von Proteinen erhöht ist, gedeckt werden. Das könnte eine Erklärung für das schnelle Erscheinen des $^{15}NH_4^+$-N in der Proteinfraktion sein.

Der Hauptpfad für den Einbau von Ammonium in den Stoffwechsel stellt das Glutaminsynthetase/Glutamatsynthase-System (GS/GOGAT) dar. Bei streßbedingtem verstärkten Proteinabbau bzw. erhöhter Photorespirationsrate wird zusätzliches Ammonium in der Zelle freigesetzt, wodurch höhere Enzymkapazitäten für die NH_4^+-Assimilation erforderlich werden. In Koniferen wurden bei Ozonexposition gesteigerte GS-Aktivitäten beobachtet. Da verschiedene krautige Pflanzen auf Ozonbelastung mit erhöhten Glutamatdehydrogenaseaktivitäten reagieren (Grandjean & Fuhrer 1989, Bender et al. 1991, Manderscheid et al. 1991, 1992), wird in der Literatur die Funktion der GDH als Streßenzym diskutiert (Srivastava & Singh 1987, Shargool et al. 1991, Melo-Oliveira et al. 1996).

Eine Erhöhung der Aktivität ammoniumassimilierender Enzyme infolge ozonbedingter Stoffwechseländerungen wäre ein Erklärungsansatz für den erhöhten $^{15}NH_4^+$-Einbau in Weizen und Mais.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die GS- und GDH-Aktivitäten aus den Blättern der exponierten Pflanzen getestet. Dabei stellte sich heraus, daß die Beeinflussung dieser Enzymaktivitäten durch die O_3-Exposition minimal war.

Auch die Bestimmung des löslichen Proteins hatte keinen Hinweis auf einen erhöhten Proteinabbau geliefert.

Nach Grandjean & Fuhrer (1989) ist die Bestimmung des löslichen Proteingehaltes möglicherweise nicht genau genug, um die Seneszenz in einem frühen Stadium zu erkennen. Wei-

terhin ist denkbar, daß zu diesem Zeitpunkt die vorhandene Kapazität der Glutaminsynthetase ausreichend ist, um das zusätzlich anfallende Ammonium zu detoxifizieren.
Unabhängig davon stellt die Bestimmung einer Enzymaktivität lediglich eine „Momentaufnahme" einer Stoffwechselaktivität dar, die durch eine Vielzahl von Faktoren modifiziert werden kann.
Dagegen ist die Bestimmung der ^{15}N-Anreicherung in den N-Fraktionen als ein über die Zeit integrierendes Meßverfahren zu betrachten und daher letztlich genauer und aussagekräftiger als die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen.

Es kann daher als gesichert angesehen werden, daß Weizen und Mais unter Einfluß erhöhter Ozonkonzentrationen verstärkt $^{15}NH_4^+$ inkorporiert haben, was über den allgemein anerkannten Einbaupfad des GS/GOGAT-Systems geschehen sein muß.

Die Resultate der ^{15}N-isotopentechnischen und enzymatischen Analysen sowie die Ergebnisse der Chlorophyllbestimmung zeigen, daß junge Maispflanzen durch O_3-Exposition weitaus stärker beeinträchtigt wurden als Weizenpflanzen, welche abgesehen von der verstärkten $^{15}NH_4^+$-Inkorporation keine Beeinflussung erkennen ließen.
Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Annahme, daß C_4-Pflanzen aufgrund ihrer niedrigeren stomatären Leitfähigkeiten weniger O_3 aufnehmen und daher in geringerem Ausmaß durch Ozonstreß gefährdet sind als C_3-Pflanzen (Volin et al. 1998).
Allerdings kann auch Ozon selbst die Stomatafunktion beeinflussen; in Abhängigkeit von der O_3-Konzentration, den Klimavariablen und der Pflanzenart kann die stomatäre Leitfähigkeit erhöht oder erniedrigt werden (Darrall 1989, Robinson et al. 1998, Grantz et al. 1999).
Weiterhin stellt die stomatäre O_3-Absorption nicht den einzigen Faktor dar, der die pflanzliche Reaktion auf Ozondepositionen bestimmt, da Pflanzen über diverse Schutz- und Reparaturmechanismen verfügen (Kangasjärvi et al. 1994, Foyer et al. 1994, Pell et al. 1997, Sgarbi et al. 1999).
Art- bzw. entwicklungsspezifische Unterschiede in der Effizienz dieser Schutzmechanismen könnten für eine größere Resistenz einer C_3-Pflanze verantwortlich sein.

So berichten auch Volin & Reich (1996), die die Ozonempfindlichkeiten der C_3-Pflanze *Agropyron smithii* und der C_4-Pflanze *Bouteloua curtipendula* verglichen, daß die C_3-Spezies kaum Beeinträchtigungen der Photosynthese und des Wachstums aufwies. Die C_4-Pflanze da-

gegen reagierte auf hohe Ozonkonzentrationen bei gleichzeitig hohem N-Versorgungsstatus mit verminderter Biomasseproduktion.
Allerdings gilt speziell Sommerweizen als besonders O_3-sensitive Pflanze (Pleijel et al. 1991, Skärby et al. 1993, Bender & Weigel 1995), während *Zea mays* als weniger ozonempfindlich beschrieben wird (Heagle et al. 1988).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf die Verwendung unterschiedlicher Kriterien für die Beurteilung der Ozonsensitivität zurückgeführt werden. So fanden Heagle et al. (1979a, 1979b), daß der Kornertrag bei Weizen infolge Ozonexposition weitaus stärker reduziert war als bei Mais. Das Wachstum der vegetativen Pflanzenteile war dagegen bei Mais stärker beeinträchtigt. Auch in den oben zitierten Arbeiten zu Sommerweizen und Mais wurden die Effekte auf den Kornertrag als Maß für die O_3-Empfindlichkeit betrachtet. Von diesem Standpunkt aus erscheint die C_3-Spezies Weizen als die stärker gefährdete.

Letztlich erlauben die in der hier vorliegenden Arbeit gefundenen Effekte noch keine generelle Aussage über die Ozonempfindlichkeit von Weizen und Mais. Es wurden zwar Anzeichen einer frühzeitigen Seneszenz bei jungen Maispflanzen festgestellt; diese müssen allerdings nicht notwendigerweise zu einer Reduzierung des Wachstums und des Ertrages führen (Bergmann et al. 1995). Da die O_3-Sensitivität sehr stark vom Entwicklungsstadium der Pflanzen abhängig ist (Bender & Weigel 1995, Carlsson et al. 1996, Lyons & Barnes 1998, Lyons et al. 1999), müßten Langzeitexpositionen über die ganze Vegetationsperiode durchgeführt werden, um die Ozonempfindlichkeit von Weizen und Mais vergleichen zu können.

4.4. Kombinationswirkungen verschiedener Stressoren

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Expositionsexperimenten wurden die Pflanzen entweder dem Einfluß von Ozon oder Stickstoffdioxid ausgesetzt. Unter Freilandbedingungen wirken dagegen mit hoher Wahrscheinlichkeit verschiedene Schadstoffe simultan bzw. sequentiell auf Pflanzen ein. So bestehen Autoabgase aus einem Gemisch aus CO, NO, NO_2 und Kohlenwasserstoffen; SO_2-Emissionen aus Kohlekraftwerken werden stets von NO und NO_2 begleitet (Wellburn 1990). Auch die Bildung des phytotoxischen Ozon ist an das Vorkommen von NO_2 gebunden, so daß diese beiden Schadgase nicht isoliert voneinander betrachtet werden können.

Da sich die pflanzliche Reaktion auf Schadstoffgemische in erheblichem Maße von der Reaktion auf Einzelsubstanzen unterscheiden kann, ist eine Berücksichtigung der möglicherweise auftretenden additiven, synergistischen oder antagonistischen Effekte für eine Einschätzung des phytotoxischen Potentials unumgänglich.
Die Sensitivität der Pflanzen gegenüber Schadstoffen bzw. Schadstoffgemischen wird desweiteren durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt. So beeinflussen Klimavariablen wie Licht, Temperatur und Luftfeuchtigkeit das Öffnungsverhalten der Stomata, wodurch der Gasaustausch zwischen Blättern und Atmosphäre reguliert wird (Bender & Weigel 1995).

Die sequentielle O_3-NO_2-Einwirkung kann eine stärkere Reduzierung des Pflanzenwachstums hervorrufen als die Exposition mit den einzelnen Gasen (Ito et al. 1985, Goodyear & Ormrod 1988, Kress & Skelly 1982, Bender et al. 1991). Bei Pflanzen, die sich noch in der vegetativen Wachstumsphase befanden, wurde allerdings auch beobachtet, daß NO_2 den negativen Ozoneffekten entgegenwirken kann (Bender et al. 1991). Dieser Effekt verlor sich, sobald die Pflanzen in die generative Phase eintraten.
Die Ursache für die stärkere Wachstumsreduktion bei sequentieller O_3-NO_2-Exposition wird in einer geringeren Assimilationskapazität für Stickstoff vermutet (Bender et al. 1991). Wie auch die eigenen Ergebnisse belegen, können Enzyme der N-Assimilation infolge Ozoneinwirkung beeinflußt werden. Ozon wirkt offenbar der NR/NiR-Induktion, die bei NO_2-Begasung vielfach nachgewiesen wurde, entgegen. Da jedoch infolge der NO_2-Aufnahme vermehrt Nitrat- und Nitritionen in der Zelle zu finden sind, besteht Gefahr, daß diese nicht schnellstmöglich metabolisiert werden können und akkumuliert werden.
Da die ozonbedingte Aktivitätsminderung der NR und NiR insbesondere bei jungen Maispflanzen gefunden wurde (vgl. 3.3.1), könnte bei kombinierter NO_2-O_3-Exposition möglicherweise eine Nitritakkumulation und eine stärkere Beeinträchtigung des Wachstums auftreten. Es muß allerdings experimentell geprüft werden, inwieweit die Ozon- bzw. Ozon-NO_2-Effekte bei Weizen und Mais vom Entwicklungsstand abhängig sind.

Die kombinierte Wirkung von NO_2 und SO_2 kann ähnliche Effekte wie die sequentielle O_3-NO_2-Exposition hervorrufen (Wellburn et al. 1981, 1990), da SO_2 die NO_2-induzierte Aktivitätserhöhung der Nitritreduktase unterdrücken kann. Somit wird die Nitritdetoxifikation gestört, wodurch die Gefahr einer akuten Schädigung erheblich erhöht wird.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß NO_2 keinesfalls als unbedenklicher zusätzlicher Stickstoffdünger betrachtet werden sollte, da gerade in der praxisrelevanten Kombination mit anderen Luftschadstoffen Gefahrenpotentiale liegen.

Vor dem Hintergrund kontinuierlich steigender atmosphärischer CO_2-Konzentrationen wird deren Wirkung auf die Vegetation und die Wechselwirkung mit anderen Schadgasen verstärkt diskutiert. Die globale CO_2-Konzentration hat sich seit der Mitte des 19. Jahrhunderts von ca. 270 µmol mol^{-1} auf 360 µmol mol^{-1} erhöht und wird den Prognosen zufolge noch vor Ende des nächsten Jahrhunderts 600 µmol mol^{-1} erreichen (Watson et al. 1990, IPCC 1996).
Insbesondere für C_3-Pflanzen wurde die wachstumsstimulierende Wirkung der erhöhten CO_2-Konzentration in der Atmosphäre nachgewiesen (Kimball et al. 1993). Neben einer Steigerung der Photosyntheserate und der Biomasseproduktion ist bei vielen Pflanzen eine Erhöhung der Wassernutzungseffizienz zu beobachten, die auf eine Verminderung der stomatären Leitfähigkeit und der Transpirationsrate zurückgeführt wird (Rogers & Dahlmann 1993, Drake et al. 1997). Da infolge der Reduzierung der stomatären Leitfähigkeit die Aufnahme von Schadgasen deutlich vermindert wird, wird erhöhten CO_2-Konzentrationen eine Schutzfunktion gegenüber atmosphärischen Schadgasen zugeschrieben (Carlsson & Bazzaz 1985, Mulchi et al. 1992, Enoch & Honour 1993, Mulholland et al. 1997, Fiscus et al. 1997, Reid et al. 1998).

Der quantitative Aspekt der Spurengasaufnahme ist allerdings nicht allein entscheidend für die phytotoxische Wirkung. Untersuchungen zur Kombinationswirkung von Ozon und erhöhten CO_2-Konzentrationen haben gezeigt, daß zwar unter diesen Bedingungen die Aufnahme von Ozon merklich verringert wurde; gleichzeitig wurde auf zellulärer Ebene unter dem Einfluß erhöhter CO_2-Konzentrationen eine gesteigerte Ozonsensitivität beobachtet (Polle et al. 1993, Barnes et al. 1995, Balaguer et al. 1995, Niewiadomska et al. 1999).
Wie die Arbeiten von Badiani et al. (1993, 1995) und Polle et al. (1993) belegen, kann das antioxidative Schutzsystem der Zelle durch erhöhte CO_2-Werte gehemmt werden. Davon sind sowohl Antioxidantien wie Ascorbat und Glutathion als auch die entsprechenden Enzymsysteme betroffen.
Durch hohe Kohlendioxidkonzentrationen wird weiterhin die Produktion von Ethylen gefördert (Abeles et al. 1992), welches mit O_3 unter Bildung hochreaktiver Radikale reagiert und somit die Gefahr einer Ozonschädigung erhöht (Salter & Hewitt 1992, Kangasjärvi 1994). Die Interaktion von Kohlendioxid und Ozon ist offenbar von komplexerer Struktur, als es zunächst angenommen wurde.

Interaktionen bestehen auch zwischen der Stickstoffversorgung und der Reaktion der Pflanzen auf atmosphärische Schadstoffe. So ist der NO_2-Effekt vom N-Ernährungsstatus der Pflanzen abhängig (Srivastava & Ormrod 1984). Bei den in dieser Arbeit vorgestellten NO_2-Expositionsexperimenten konnte allerdings kein Einfluß der über das Bodensubstrat applizierten Nitratmenge auf die Spurengasaufnahme und auf ausgewählte Parameter des N-Stoffwechsels (Enzymaktivitäten, Nitrit- und Ammoniumgehalte) gefunden werden.
Pell et al. (1990) und Volin & Reich (1996) beobachteten eine gesteigerte Ozonsensitivität bei Pflanzen, die unter hohem N-Angebot gewachsen waren. Vontiedemann (1996) dagegen berichtete, daß Weizenpflanzen durch hohe N-Versorgung vor Ozonschäden geschützt werden; der krankheitsfördernde Effekt hoher Stickstoffkonzentrationen wurde hingegen unter O_3-Einfluß verstärkt. Für die Interpretation dieser widersprüchlichen Resultate fehlen bislang noch allgemeingültige Vorstellungen über die Wechselwirkung zwischen Nährstoffversorgung und Ozonsensitivität (Bender & Weigel 1995).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Pflanzen zunehmend der Einwirkung komplexer Schadstoffkombinationen ausgesetzt sind, wodurch sie in stärkerem Maße beeinträchtigt werden können als durch die Einwirkung einzelner Schadgase. Das gilt gleichermaßen für C_3- und C_4-Spezies. C_3-Pflanzen werden im allgemeinen als stärker gefährdet eingestuft, da sie aufgrund höherer stomatärer Leitfähigkeiten größere Mengen an gasförmigen Schadstoffen aufnehmen. Wie von Volin & Reich (1996) gezeigt wurde, ist die stomatäre Leitfähigkeit aber nicht der einzig bestimmende Faktor für die Sensitivität einer Spezies.
Die in dieser Arbeit vorgestellten Expositionsversuche mit einzelnen Schadgasen wurden mit der Zielsetzung durchgeführt, kausale Zusammenhänge zwischen Stressor und phytotoxischer Wirkung in Abhängigkeit von der Pflanzenart bzw. dem Stoffwechseltyp darzustellen. Aufgabe zukünftiger Experimente wird sein, diese kausalen Beziehungen auch unter den Bedingungen komplexer Expositionssituationen in Langzeitversuchen zu studieren und Modelle für die Interaktionswirkungen verschiedener Stressoren zu entwickeln.

5. Zusammenfassung

Die gegenwärtige Emissionssituation in stark industrialisierten Gebieten ist infolge des kontinuierlich ansteigenden Kraftfahrzeugverkehrsaufkommens durch hohe Konzentrationen von Ozon und NO_x gekennzeichnet. Diese Spurengase können in Ökosysteme eingetragen und dort von Pflanzen aufgenommen werden, wodurch deren Stoffwechselvorgänge sowie Zellstrukturen in erheblichem Maße beeinflußt werden können. Infolgedessen treten häufig Störungen des pflanzlichen Wachstums auf, die das Gleichgewicht in natürlichen und naturnahen Ökosystemen gefährden können bzw. den landwirtschaftlichen Ertrag bei Kulturpflanzen beeinträchtigen.
Ozon gilt dabei als der Luftschadstoff mit dem bedeutendsten phytotoxischen Potential, während NO_x als eutrophierender Faktor und als Vorläufersubstanz des O_3 fungiert. Die pflanzliche Reaktion auf diese Schadgase variiert stark in Abhängigkeit von der Art, wofür bislang noch keine befriedigenden Erklärungen vorliegen.

Die Zielsetzung der hier vorgestellten Arbeit bestand darin, Aussagen über die Wirkung praxisrelevanter Ozon- und Stickoxidkonzentrationen auf Pflanzen, die unterschiedliche Photosynthesetypen repräsentieren, zu erhalten. Da vermutlich ein Komplex von morphologischen und physiologischen Merkmalen für die Toleranzunterschiede der Arten verantwortlich ist, wurden von der vergleichenden Untersuchung von C_3- und C_4-Pflanzen Hinweise auf die die Schadstofftoleranz beeinflussenden pflanzlichen Merkmale sowie die noch nicht vollständig bekannten Mechanismen der Schadstoffwirkung erwartet.

Als Untersuchungsobjekte wurden die C_3-Pflanze Sommerweizen (*Triticum aestivum*) und die C_4-Spezies Mais (*Zea mays*) eingesetzt, die im mitteldeutschen Raum bedeutende Kulturpflanzen darstellen. Die Pflanzenanzucht und die Expositionsversuche wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt.
Die Untersuchungen zur Aufnahme und zum Einbau von NO_2 wurden in einer Expositionskammer des Institutes für Radioagronomie des Forschungszentrums Jülich durchgeführt. Die Pflanzen wurden für jeweils 8 h mit 25 bzw. 50 ppb ^{15}N-markiertem Stickstoffdioxid exponiert und sofort oder mit 24 h Verzögerung geerntet und schockgefroren.
Da atmosphärische N-Einträge auch als feuchte Deposition auf den Boden gelangen und den Pflanzen dann in Form von gelöstem Nitrat und Ammonium zur Verfügung stehen, erfolgten

parallel zu den $^{15}NO_2$-Expositionen Düngungsexperimente mit verschiedenen Konzentrationen an $K^{15}NO_3$, $(^{15}NH_4)_2SO_4$ und $NH_4{}^{15}NO_3$ (0-200 kg N/ha).
Die Ozonbegasung fand in den open top-Kammern der FAL Braunschweig statt. Die Pflanzen wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen 10 h täglich mit Ozonkonzentrationen von durchschnittlich 72 ppb exponiert. Die Stickstoffversorgung bestand in definierten Gaben von ^{15}N-markiertem KNO_3 bzw. $(NH_4)_2SO_4$.

Zur Charakterisierung der pflanzlichen Reaktion auf die Stickstoff- bzw. Ozonexpositionen wurden insbesondere die Wirkungen auf den N-Metabolismus von Weizen und Mais untersucht. In den verschiedenen Pflanzenfraktionen (Blätter, Sproßachse, Wurzeln) wurden Stickstoffgehalte, ^{15}N-Exzeßmengen, Metabolitgehalte (Nitrat, Nitrit, Ammonium, ausgewählte Aminosäuren) sowie *in vitro* Enzymaktivitäten der NADH-Nitratreduktase, Nitritreduktase, Glutaminsynthetase und NADH-Glutamatdehydrogenase bestimmt.

Die nachfolgend zusammengefaßten Ergebnisse der experimentellen Arbeiten belegen, daß der Stickstoffmetabolismus der C_3-Spezies Weizen und der C_4-Spezies Mais durch die Einwirkung atmosphärischer N- und O_3-Depositionen beeinflußt wird, wobei Unterschiede in der Art bzw. Stärke der Reaktion beobachtet wurden:

- Mittels **$^{15}NO_2$-Exposition** und nachfolgender emissionsspektrometrischer ^{15}N-Analyse konnte gezeigt werden, daß junge Weizen- und Maispflanzen gasförmiges NO_2 in Abhängigkeit von der Expositionskonzentration über den Sproß aufnehmen und in ihre Biomasse einbauen.
- Bezüglich der absorbierten $^{15}NO_2$-Menge wurden deutliche quantitative Unterschiede zwischen den untersuchten Arten gefunden. Weizenpflanzen nahmen pro Blattflächeneinheit ca. doppelt soviel $^{15}NO_2$ auf wie Maispflanzen. Infolge dieser Differenzen in der NO_2-Absorption, die durch das unterschiedliche Stomataverhalten von C_3- und C_4-Pflanzen bedingt sind, könnte die C_3-Spezies Weizen in stärkerem Maße durch hohe atmosphärische Stickstoffdioxidkonzentrationen beeinflußt bzw. beeinträchtigt werden.
- Unmittelbar nach Ende der achtstündigen $^{15}NO_2$-Exposition wurde der Hauptanteil des aufgenommenen $^{15}NO_2$-N in der Blättern von Weizen und Mais gefunden; bereits zu diesem Zeitpunkt konnte jedoch auch die Verlagerung eines Teils des $^{15}NO_2$-N in die Sproßachsen- und Wurzelfraktion nachgewiesen werden. Diese Translokation des $^{15}NO_2$-N von den Blättern in die anderen Pflanzenteile fand bei Mais in deutlich stärkerem Maße statt.

- Die Analyse der ^{15}N-Exzeßgehalte in den N-Fraktionen ergab, daß die Metabolisierung des $^{15}NO_2$-N sehr rasch erfolgt ist. Unmittelbar im Anschluß an die Exposition konnte bereits im Protein ^{15}N nachgewiesen werden.
- Unter den gegebenen Expositionsbedingungen konnte weder eine Beeinflussung der untersuchten Enzymaktivitäten noch eine meßbare Akkumulation der toxischen N-Metabolite Nitrit und Ammonium festgestellt werden.

Es wird davon ausgegangen, daß die Induktion der stickstoffassimilierenden Enzyme infolge der reichlichen N-Versorgung über das Bodensubstrat in ausreichendem Maße gewährleistet war und somit der zusätzlich über den Sproß aufgenommene Stickstoff problemlos assimiliert werden konnte.

Die Ergebnisse der parallel durchgeführten **N-Düngungs- bzw. ^{15}N-Tracerexperimente** über das Bodensubstrat verdeutlichen die Problematik erhöhter N-Einträge in Agrarökosysteme:

- Mit steigenden Stickstoffkonzentrationen in der Nährlösung erhöhten sich die N-Aufnahmeraten über die Wurzeln, wobei Weizenpflanzen unabhängig von der Stickstoffquelle eine höhere N-Aufnahme (bezogen auf die Biomasse) aufwiesen als Maispflanzen.
- Wenn den Pflanzen nur eine der N-Quellen (Nitrat oder Ammonium) zur Verfügung stand, wurden insbesondere bei Weizen etwas höhere Aufnahmeraten für $^{15}NH_4^+$ festgestellt. Wurde den Pflanzen $NH_4{}^{15}NO_3$ appliziert, konnte bei beiden Spezies eine Verminderung der $^{15}NO_3^-$-Aufnahme beobachtet werden.
-Obgleich Ammonium in stärkerem Maße aufgenommen wurde als Nitrat, wiesen ammoniumgedüngte Pflanzen vergleichsweise niedrigere Wachstumsraten auf. Dieser Effekt war bei Weizen deutlich ausgeprägter als bei Mais.
- In Weizen wurden stets signifikant höhere zelluläre NH_4^+-Konzentrationen gefunden als in Mais. Bei Ammonium-Düngung stieg der Ammoniumgehalt in Blättern und Wurzeln von Weizen deutlich an, während in Maisblättern keine Steigerung des NH_4^+-Gehaltes verzeichnet werden konnte; lediglich Maiswurzeln reagierten auf Ammoniumdüngung mit einer leichten Erhöhung des NH_4^+- Gehaltes.

Diese Resultate belegen, daß die C_3-Pflanze Weizen in stärkerem Maße gefährdet ist, toxische zelluläre Ammoniumkonzentrationen zu erreichen. Demnach könnten C_3-Pflanzen insbesondere bei hohen Ammoniumeinträgen stärker von negativen NH_4^+-Effekten bedroht sein als C_4-Pflanzen.

- Auffällig war die deutlich höhere Glutaminsynthetase-Aktivität in Weizen.

Die Glutamatdehydrogenase aus Weizenblättern reagierte auf steigende Ammoniumkonzentrationen in der Nährlösung mit einer deutlichen Aktivitätserhöhung. Dieser Fakt unterstützt die Hypothese, daß der Glutamatdehydrogenase unter Streßbedingungen (Ammoniumstreß) eine Entgiftungsfunktion im Stoffwechsel zukommt.

- Die quantitative Bestimmung der zellulären Konzentrationen ausgewählter Aminosäuren ergab in ammoniumgedüngten Pflanzen besonders hohe Werte für Asparagin, welches als N-Speicher- und Transportform gilt. Dieser Effekt, der bei Weizenpflanzen besonders groß war, stellt ein Indiz für die Notwendigkeit einer temporären Stickstoffspeicherung dar, um eine toxische Ammoniumakkumulation zu vermeiden.

Die Ergebnisse der $^{15}NO_2$-Exposition und der Düngungsexperimente über das Bodensubstrat deuten darauf hin, daß die C_3-Spezies Weizen aufgrund höherer N-Aufnahmeraten über Blätter und Wurzeln sowie einer begrenzten Detoxifikationskapazität für Ammonium stärker durch Stickstoffeinträge beeinträchtigt werden kann als die C_4-Pflanze Mais. Infolge einer solchen N-Eutrophierung können z.B. Schädigungen auf physiologischer oder makroskopischer Ebene, Nährstoffimbalancen und Verminderung der Resistenz gegenüber biotischen und abiotischen Streßfaktoren auftreten.

Unter den in dieser Arbeit beschriebenen Bedingungen wurden zwar keine makroskopisch sichtbaren Schädigungen der Pflanzen gefunden, allerdings kann nicht von einer Unbedenklichkeit der eingesetzten umweltrelevanten N-Expositionskonzentrationen ausgegangen werden.

Durch Langzeitversuche müßte überprüft werden, ob die applizierten Expositionskonzentrationen auch bei langfristiger Einwirkung keine negativen Auswirkungen auf den pflanzlichen Stoffwechsel haben.

Die vorliegenden Ergebnisse der **Ozonexposition** belegen, daß der Stickstoffmetabolismus in jungen Weizen- und Mais-Pflanzen durch die Einwirkung von Ozon beeinflußt wird:

- Die Aktivitäten von Enzymen des N-Metabolismus wurden unter den gegebenen Bedingungen nur geringfügig durch die Ozoneinwirkung beeinflußt. Am deutlichsten wurde die NADH-Nitratreduktase-Aktivität aus Maisblättern erniedrigt, während die NR-Aktivität in Weizenblättern kaum verringert war. Die Glutaminsynthetase aus Weizenblättern reagierte auf Ozonexposition mit einer Aktivitätserhöhung.

- Tracerexperimente mit $^{15}NO_3^-$ zeigten, daß der Einbau von Nitrat-Stickstoff in Weizenpflanzen unter Ozoneinwirkung nahezu unverändert blieb, während bei Maispflanzen deutlich

verringerte Einbauraten für Nitrat-Stickstoff festgestellt wurden. Dieser Effekt könnte auf eine ozonbedingte Beeinträchtigung der Nitrataufnahme und -assimilation (Nitratreduktase-Aktivität) zurückzuführen sein.

Der Einbau von $^{15}NH_4^+$-Stickstoff war bei Weizen und Mais unter Ozoneinfluß deutlich erhöht.

- Bei der Untersuchung der Pigmentgehalte wurden in den Blättern ozonbegaster Maispflanzen verminderte Gehalte an Chlorophyll a und b sowie an Carotinoiden festgestellt, während die Pigmentgehalte in Weizenblättern unverändert blieben.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß junge Maispflanzen unter den beschriebenen Bedingungen anfälliger auf Ozonstreß reagierten als Weizenpflanzen.

Hier stellte sich die Frage, ob sich die Maispflanzen zum Zeitpunkt der O_3-Exposition in einer besonders sensitiven Wachstumsphase befanden oder ob die Ursache für diese Reaktion in den anatomischen und physiologischen Besonderheiten der C_4-Pflanzen (z.B. Lokalisation der N-assimilierenden Enzyme) zu suchen ist.

Grundsätzlich kann aus den vorliegenden Ergebnissen abgeleitet werden, daß von erhöhten Stickstoffdepositionen und Ozonkonzentrationen ein deutliches Gefährdungspotential für den pflanzlichen Stoffwechsel ausgeht.

Unter den gegebenen Bedingungen wiesen Weizenpflanzen eine größere Sensitivität gegenüber Stickstoffeinträgen auf, während Maispflanzen durch die Ozonexposition vergleichsweise stärker beeinträchtigt wurden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß C_4-Pflanzen nicht generell als unempfindlicher gegenüber atmosphärischen Schadstoffen betrachtet werden dürfen. C_4-Pflanzen absorbieren zwar weniger Schadgase über ihre Blätter und weisen aufgrund ihres effektiven C-Stoffwechsels große Detoxifikationskapazitäten auf; die Sensitivität gegenüber einem Schadstoff wird jedoch von einem Komplex weiterer pflanzlicher Merkmale mitbestimmt.

Auch Faktoren wie Zeitpunkt und Dauer der Schadgasexposition sowie die kombinierte Einwirkung verschiedener Stressoren können die pflanzliche Reaktion maßgeblich beeinflussen.

Daher wären Expositionsversuche über längere Zeiträume, simultane Expositionen mit verschiedenen Schadstoffen sowie die Einbeziehung weiterer Pflanzenarten (Kultur- und Wildpflanzen) notwendig, um weitergehende Aussagen über die Beeinflussung des pflanzlichen Stoffwechsels sowie den Zusammenhang zwischen physiologischen Merkmalen und Schadstofftoleranz bzw. -sensitivität treffen zu können.

6. Literatur

Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit, M.E., 1992: Ethylene in plant biology. 2. Aufl., Academic Press, London, 414ff.

Andrews, M., Sprent, J.I., Raven, J.A., Eady, P.E., 1999: Relationships between shoot to root ratio, growth and leaf soluble protein concentration of *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* and *Triticum aestivum* under different nutrient deficiencies. Plant Cell Environ. 22, 137-147.

Aslam, M., Travis, R.L., Rains, D.W., Huffaker, R.C., 1996: Effect of ammonium on the regulation of nitrate and nitrite transport systems in roots of intact barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. Planta 200, 58-63.

Bäck, J., Vanderklein, D.W., Topa, M.A., 1999: Effects of elevated ozone on CO_2 uptake and leaf structure in sugar male under two light environments. Plant Cell Environ. 22, 137-147.

Badiani, M., D'Annibale, A., Paolacci, A.R., Miglietta, F., Raschi, A., 1993: The antioxidant status of soybean (*Glycine max*) leaves grown under natural CO_2 enrichment in the field. Australian J. Plant Physiol. 20, 275-284.

Badiani, M., Paolacci, A.R., D'Annibale, A., Miglietta, F., Raschi, A., 1995: Can rising CO_2 alleviate oxidant risk for the plant cell? Testing the hypothesis under natural CO_2 enrichment. In: Raschi, A., Miglietta, F. (eds.): Carbon dioxide springs and their use in biological research. Cambridge University Press.

Balaguer, L., Barnes, J.D., Panicucci, A., Borland, A.M., 1995: Production and utilization of assimilates in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves exposed to elevated O_3 and/or CO_2. New Phytol. 129, 557-568.

von Ballmoos, P., Nussbaum, S., Brunold, C., 1993: The relationship of nitrate reductase activity to uptake and assimilation of atmospheric $^{15}NO_2$-nitrogen in needles of norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). Isotopes Environ. Health Stud. 29, 59-70.

von Ballmoos, P., Ammann, M., Egger, A., Suter, M., Brunold, C., 1998: NO_2-induced nitrate reductase activity in needles of Norway spruce (*Picea abies*) under laboratory and field conditions. Physiol. Plant. 102, 596-604.

Bambauer, A., Brantner, B., Paige, M., Novakov, T., 1994: Laboratory study of NO_2 reaction with dispersed and bulk liquid water. Atmos. Environ. 28, 3225-3232.

Barneix, A.J., Causin, H.F., 1996: The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. J. Plant Physiol. 149, 358-362.

Barnes, J.D., Ollerenshaw, J.H., Whitfield, C.P., 1995: Effects of elevated CO_2 and/or O_3 on growth, development and physiologie of wheat (*Triticum aestivum* L.). Global Change Biology 1, 129-142.

Barnes, J.D., Wellburn, A.R., 1998: Air pollution combinations. In: De Kok, L.J., Stuhlen, I. (eds.): Responses of plant metabolism to air pollution and global change. Leiden, The Netherlands: Backhuys, 147-164.

Barnes, J.D., Bender, J., Lyons, T., Borland, A., 1999: Natural and man-made selection for air pollution resistance. J. Exp. Bot. 50, 1423-1435.

Bender, J., Weigel, H.-J., Jäger, H.J., 1991: Response of nitrogen metabolism in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) after exposure to ozone and nitrogen dioxide, alone and in sequence. New Phytol. 119, 261-267.

Bender, J., Weigel, H.-J., Jäger, H.J., 1994: Zur Rolle von Luftverunreinigungen unter veränderten Klimabedingungen - Untersuchungen zur Wechselwirkung von Ozon und erhöhten Kohlendioxidkonzentrationen auf Kulturpflanzen. In: Kuttler, W., Jochimsen, M. (Hrsg.): Immissionsökologische Forschung im Wandel der Zeit. Festschrift für Robert Guderian. Essener Ökologische Schriften 4, 233-245.

Bender, J., Weigel, H.-J., 1995: Zur Gefährdung landwirtschaftlicher Kulturpflanzen durch troposphärische Ozonkonzentrationen. Ber. Ldw. 73, 136-156.

Bergmann, E., Bender, J., Weigel, H.J., 1995: Growth responses and foliar sensitivities of native herbaceous species to ozone exposures. Water, Air and Soil Pollution 85, 1437-1442.

Bobbink, R., 1991: Effects of nutrient enrichment in Dutch chalk grassland. J. Appl. Ecol. 28, 28-41.

Bobbink, R., Hornung, M., Roelofs, J.G.M., 1998: The effects of air-born nitrogen pollutants on species diversity in natural and semi-natural European vegetation. J. of Ecol. 86, 717-738.

Bohnert, H.J., Nelson, D.E., Jensen, R.G., 1995: Adaptions to environmental stresses. Plant Cell 7, 1099-1111.

Borsani, O., Díaz, P., Monza, J., 1999: Proline is involved in water stress responses of *Lotus corniculatus* nitrogen fixing and nitrate fed plants. J. Plant Physiol. 155, 269-273.

Brown, R.H., 1978: A difference in nitrogen use efficiency in C_3 and C_4 plants and its implications in adaption and evolution. Crop Sci. 18, 93-98.

Brown, R.H., 1975: Variations in anatomy, associations, and origins of Kranz tissue. Am. J. Bot. 62, 395-402.

Brown, R.H., Wilson, J.R. (1983): Nitrogen response of *Panicum* species differing in CO_2 fixation pathway. II. Carbon dioxide exchange characteristics. Crop Sci. 23, 1154-1159.

Cammaerts, D., Jacobs, M., 1985: A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. Planta 163, 517-526.

Canvin, D.T., 1990: Photorespiration and CO_2-concentrating mechanisms. In: Dennis, D.T., Turpin, D.H. (eds.): Plant physiology, biochemistry and molecular biology. Langman Scientific-Technical, Singapore, 253-273.

Carlsson, R.W., Bazzaz, F.A., 1985: Plant response for SO_2 and CO_2. In: Winner, W.E., Mooney, H.A., Goldstein, R.A (eds.): Sulfur dioxide and vegetation. Stanford University press, Stanford, 313-331.

Carlsson, A.S., Wallin, G., Sandelius, A.S., 1996: Species- and age-dependent sensitivity to ozone in young plants of pea, wheat and spinach: Effects on acyl lipid and pigment content and metabolism. Physiol. Plant. 98, 271-280.

Cataldo, D.A., Haroon, M., Schrader, L.E., Youngs, V.L., 1975: Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 6, 71-80.

Causin, H.F., Barneix, A.J., 1993: Regulation of NH_4^+ uptake in young wheat plants: Effect of root ammonium concentration and amino acids. Plant and Soil 151, 211-218.

Chiang, H., Dandekar, A., 1995: Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* Heynh during development and in response to desiccation. Plant Cell Environ. 18, 1280-1290.

Collatz, G.J., Ribas-Carbo, M., Berry, J.A., 1992: Coupled photosynthesis-stomatal conductance model for leaves of C_4 plants. Aust. J. Plant Physiol. 19, 519-538.

Collatz, G.J., Berry, J.A., Clark, J.S., 1998: Effects of climate and atmospheric CO_2 partial pressure on the global distribution of C_4 grasses: present, past, and future. Oecologia 114, 441-454.

Colmer, T.D., Bloom, A.J., 1998: A comparison of NH_4^+ and NO_3^- net fluxes along roots of rice and maize. Plant Cell Environ. 21, 240-246.

Conroy, J.P. (1992): Influence of elevated atmospheric CO_2 concentration on plant nutrition. Aust. J. Bot. 40, 445-456.

Cramer, M.D., Lewis, O.A.M., Lips, S.H., 1993: Inorganic carbon fixation and metabolism in maize roots as affected by nitrate and ammonium nutrition. Physiol. Plant. 89, 632-639.

Cruz, C., Lips, S.H., Martins-Loução, M.A., 1993: Interactions between nitrate and ammonium during uptake by carob seedlings and the effect of earlier nitrogen nutrition. Physiol. Plant. 89, 544-551.

Dai, Z., u, M.S.B., Edwards, G.E., 1996: Oxygen sensitivity of photosynthesis and photorespiration in different photosynthetic types in the genus *Flaveria*. Planta 198, 563-571.

Darrall, N.M., 1989: The effect of air pollutants on physiological processes in plants. Plant Cell Environ. 12, 1-30.

Davison, A.W., Barnes, J.D., 1993: Predisposition to stress following exposure to air pollution. In: Jackson, M.B., Black, C.R. (eds.): Interacting stresses on plants in a changing climate. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 111-123.

Drake, B.G., Gonzàlez-Meler, M.A., Long, S.P., 1997: More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO_2 ? Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 48, 609-639.

Durmishidze, S.W., Nutsubidze, N.N.,1976: Absorption and conversion of nitrogen dioxide by higher plants. Dokl. Biochem. 227, 104-107.

Duyzer, J., Fowler, D., 1994: Modelling land atmosphere exchange of gasous oxides of nitrogen in Europe. Tellus 46B, 353-372.

Edfast, A.-B., Näsholm, T., Ericsson, A., 1990: Free amino acid concentrations in needles of Norway spruce and Scots pine trees on different sites in areas with two levels of nitrogen deposition. Can. J. Forest Res. 20, 1132-1136.

Ehleringer, J.E., Cerling, T.E., Helliker, B.R., 1997: C_4 photosynthesis, atmospheric CO_2, and climate. Oecologia 112, 285-299.

Einarsson, S., Josefsson, B., Lagerkvist, S., 1983: Determination of amino acids with 9-fluorenyl-methyl-chloro-formate and reversed-phase high performance liquid chromatography. J. Chromatography 282, 609-618.

Elstner, E.F., Hippeli, S., 1995: Schadstoffe aus der Luft. In: Hock, B., Elstner, E.F. (eds.): Schadwirkungen auf Pflanzen. Lehrbuch der Pflanzentoxikologie. 3. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 79-117.

Enoch, H.Z., Honour, S.J., 1993: Significance of increasing ambient CO_2 for plant growth and survival, and interactions with air pollution. In: Jackson, M.B., Black, C.R. (eds.): Interacting stresses on plants in a changing climate. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 53-75.

Ericsson, A., Nordén, L.-G., Näsholm, T., Walheim, M., 1993: Mineral nutrient imbalances and arginin concentrations in needles of *Picea abies* (L.) Karst. From two areas with different levels of airborne deposition. Trees 8, 67-74.

Faust, H., 1981: FAO/IAEA interregional training course on the use of ^{15}N in soil science and plant nutrition. ZFI-Mitteilungen. Berichte des Zentralinstituts für Isotopen- und Strahlenforschung, Leipzig 38, 176.

Ferrario, S., Valadier, M.-H., Morot-Gaudry, J.-F., Foyer, C.H., 1995: Effects of constitutive expression of nitrate reductase in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* L. in response to varying nitrogen supply. Planta 196, 288-294.

Finnan, J.M., Jones, M.B., Burke, J.I., 1996: A time-concentration study on the effects of ozone on spring wheat (*Triticum aestivum* L.). 1. Effects on yield. Agriculture Ecosystems & Environment 57, 2-3.

Fiscus, E.L., Reid, C.D., Miller, J.E, Heagle, A.S., 1997: Elevated CO_2 reduces O_3 flux and O_3-induced yield losses in soybeans: possible implications for elevated CO_2 studies. J. Exp. Bot. 48, 307-313.

Fomin, A., Sallenave, R., 1996: The effects of gaseous NO_2 on nitrate assimilation and growth in *Spirodela polyrhiza*. Angew. Bot. 70, 144-149.

Forni, L.G., Mora-Arellano, V.O., Packer, J.E., Willison, R.E., 1986: Nitrogen dioxide and related free radicals: electron transfer reactions with organic compounds in solutions containing nitrite or nitrate. J. of the Chemical Society Perkin Transactions 2, 1-6.

Foot, J.P., Caporn, S.J.M., Lee, J.A., Ashenden, T.W., 1996: The effect of long-term ozon fumigation on the growth, physiology and frost sensitivity of *Calluna vulgaris*. New Phytol. 133, 503-511.

Fowler, D., Flechard, C., Skiba, U., Coyle, M., Cape, J.N., 1998: The atmospheric budget of oxidized nitrogen and ist role in ozone formation and deposition. New Phytol. 139, 11-23.

Fox, G.G., Ratcliffe, R.G., Robinson, S.A., Stewart, G.R., 1995: Evidence of deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: commentary. Can. J. Bot. 73, 1112-1115.

Foyer, C.H., Descourvière, P., Kunert, K.J., 1994: Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. Plant Cell Environ. 17, 507-523.

Frommer, W.B., Kwart, M., Hirner, B., Fischer, W.N., Hummel, S., Ninnemann, O., 1994: Transporters for nitrogenous compounds in plants. Plant Mol. Biol. 26, 1651-1670.

Fuhrer, J., Egger, A., Lehnherr, B., Grandjean, A., Tschannen, W., 1989: Effects of ozone on the yield of spring wheat (*Triticum aestivum* L., cv. Albis) grown in open-top field chambers. Environ. Pollut. 60, 273-289.

Fuhrer, J., 1996: Gasförmige Luftschadstoffe. In: Brunold, C., Rüegsegger, A., Brändle, R. (Hrsg.): Stress bei Pflanzen: Ökologie, Physiologie, Biochemie, Molekularbiologie. Verlag Paul Haupt, Bern, Stuttgart, Wien, 221-262.

Gimeno, B.S., Bermejo, V., Reinert, R.A., Zheng, Y., Barnes, J.D., 1999: Adverse effects of ambient ozone on watermelon yield and physiology at a rural site in Eastern Spain. New Phytol. 144, 245-260.

Glick, R.E., Schlagnhaufer, C.D., Arteca, R.N., Pell, E.J., 1995: Ozone-induced ethylene emission accelerates the loss of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and nuclear-encoded mRNAs in senescing potato leaves. Plant Physiol. 109, 891-898.

Goodyear, S.N., Ormrod, D.P., 1988: Tomato response to concurrent and sequential NO_2 and O_3 exposures. Environ. Pollut. 51, 315-326.

Grandjean, A., Fuhrer, J., 1989: Growth and leaf senescence in spring wheat *Triticum aestivum*) grown at different ozone concentrations in open-top field chambers. Physiol. Plant. 77, 389-394.

Grantz, D.A., Farrar, J.F., 1999: Acute exposure to ozone inhibits rapid carbon translocation from source leaves of Pima cotton. J. Exp. Bot. 50, 1253-1262.

Grantz, D.A., Zhang, X., Carlson, T., 1999: Observations and model simulations link stomatal inhibition to impaired hydraulic conductance following ozone exposure in cotton. Plant Cell Environ. 22, 1201-1210.

Greenwood, E.A.N. (1976): Nitrogen stress in plants. Adv. Agron. 28, 1-35.

Gregory, R.P.F., 1989: Biochemistry of photosynthesis (3nd edn.). John Wiley, Chichester.

Gustavsson, B., Betnér, I., 1990: Fully automated amino acid analysis for protein and peptide hydrolysates by precolumn derivatization with 9-fluorenylmethylchloroformate and 1-aminoadamantane. J. Chromatography 507, 67-77.

de la Haba, P., Agüera, E., Maldonado, J.M., 1990: Differential effects of ammonium and tungsten on nitrate and nitrite uptake and reduction by sunflower plants. Plant Sci. 70, 21-26.

Hadwiger-Fangmeier, A., Fangmeier, A., Jäger, H.-J., 1992: Ammoniak in der bodennahen Atmosphäre - Emission, Immission und Auswirkungen auf terrestrische Ökosysteme. Forschungsberichte zum Forschungsprogramm des Landes Nordrhein-Westfalen „Luftverunreinigungen und Waldschäden" Nr. 28. Ministerium für Umwelt, Raumordnung und Landwirtschaft des Landes Nordrhein-Westfalen.

Hanson, P.J., Lindberg, S.E., 1991: Dry deposition of reactive nitrogen compounds: a review of leaf, canopy and non-foliar measurements. Atmos. Environ. 25A, 1615-1634.

Hare, P.D., Cress, W.A., van Staden, J., 1999: Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. J. Exp. Bot. 50, 413-430.

Hatch, M.D.,1987: C_4 photosynthesis: A unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. Biochim. Biophys. Acta 895, 81-106.

Heagle, A.S., Philbeck, R.B., Knott, W.M., 1979a: Thresholds for injury, growth and yield loss caused by ozone on field corn hybrids. Phytopathol. 69,21-26.

Heagle, A.S., Spencer, S., Letchworth, M.B., 1979b: Yield responses of winter wheat to chronic doses of ozone. Can. J. Bot. 57, 1999-2005.

Heagle, A.S., Kress, L.W., Temple, P.J., Kohut, R.J., Miller, J.E., Heggestad, H.E., 1988: Factors influencing ozone dose-reponse relationships in open-top field chamber studies. In: Heck, W.W., Taylor, O.C., Tingey, D.T., (eds.): Assessment of crop loss from air pollutants, Elsevier Applied Science. London, New York, 141-179.

Heagle , A.S., 1989: Ozone and crop yield. Annu. Rev. Phytopathol. 27, 397-423.

Heagle, A.S., Miller, J.E., Pursley, W.A., 1999: Ozone stress, carbon dioxide enrichment, and nitrogen fertility interactions in cotton. Crop Science 39, 731-741.

Heath, A.S., 1994: Alterations of plant metabolism by ozone exposure. In: Alscher, R.G., Wellburn; A.R. (eds.): Plant responses to the gaseous environment. Chapman & Hall, London, 121-145.

Heath, R.L., Taylor, G.E., 1997: Physiological processes and plant responses to ozone exposure. In: Sandermann, H., Wellburn, A.R., Heath, R.L. (eds.): Forest decline and ozone. Ecological studies, vol. 127. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 317-368.

Heber, U., Kaiser, W., Luwe, M., Kindermann, G., Veljovic-Javonovic, S., Yin, Z., Pfanz, H., Slovik, S., 1995: Air pollution, photosynthesis and forest decline: interactions and consequences. In: E.-D. Schulze, M.M. Caldwell (eds.): Ecophysiology of photosynthesis. Ecological Studies, Vol. 100, Springer Berlin, Heidelberg, New York, 279-296.

Heck, W.W., Adams, R.M., Cure, W.W., Heagle, A.S., Heggestad, H.E., Kohut, H.E., Kress, L.W., Rawlings, J.O., Clifton Taylor, O., 1983: A reassessment of crop loss from ozone. Environ. Sci. Technol. 17, 573-581.

Hewitt, C.N., Kok, G.L., Fall, R., 1990: Hydroperoxides in plants exposed to ozone mediate air pollution damage to alkene emitters. Nature 344, 56-58.

Hill, A.C., 1971: Vegetation, a sink for atmospheric pollutants. J. Air Pollution Control Assoc. 21, 341-346.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950: The water-culture method for growing plants without soil. Calif. Agr. Exp. Sta. Circ. 347, 1-39.

Huber, S.C., Hall, T.C., Edwards, G.E. (1976): Differential localisation of Fraction I protein between chloroplast types. Plant Physiol. 57, 730-735.

Hufton, C.A., Besford, R.T., Wellburn, A.R., 1996: Effects of NO (+NO_2) pollution on growth, nitrate reductase activities and associated protein contents in glasshouse lettuce grown hydroponically in winter with CO_2 enrichment. New Phytologist 133, 495-501.

Huhn, G., Schulz, H., 1996: Contents of free amino acids in Scots pine needles from field sites with different levels of nitrogen deposition. New Phytologist 134, 95-101.

Imsande, J., Touraine, B., 1994: N demand and the regulation of nitrate uptake. Plant Physiol. 105, 3-7.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), 1996: Climate change 1995. In: Houghton, J.T., Meira Filho, L.G., Callander, B.A., Harris, N., Kattenberg, A., Maskell, K. (eds.): The science of climate change. Cambridge University Press, Cambridge, 572.

Iqbal, M., Abdin, M.Z., Mahmooduzzafar, M., Yunus, M., Agrawal, M., 1996: Resistance mechanisms in plants against air pollution. In: Yunus, M., Iqbal, M. (eds.): Plant response to air pollution. John Wiley & Sons Ltd, 195-240.

Ito, O., Okano, K., Kuroiwa, M., Totsuka, T., 1985: Effects of NO_2 and O_3 alone or in combination on kidney bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.): growth, partitioning of assimilates and root activities. J. Exp. Bot. 36, 652-667.

Ito, O., Okano, K., Totsuka, T., 1986: Effects of NO_2 and O_3 exposure alone or in combination on kidney bean plants: amino acid content and composition. Soil Science and Plant Nutrition 32, 351-363.

Ivashikina, N.V., Sokolov, O.A., 1997: Regulation of nitrate uptake and distribution in maize seedlings by nitrate, nitrite, ammonium and glutamate. Plant Science 123, 29-37.

Jackson, W.A., Volk, R.J., 1995: Attributes of the nitrogen uptake systems of maize (*Zea mays* L.): maximal suppression by exposure to both nitrate and ammonium. New Phytol. 130, 327-335.

Jung, K., Rolle, W., Schlee, D., Tintemann, H., Gnauk, T., Schüürmann, G., 1994: Ozone effects on nitrogen incorporation and superoxide dismutase activity in spruce seedlings (*Picea abies* L.). New Phytol. 128, 505-508.

Kaji, M., Yoneyama, T., Totsuka, T., Iwaki, H., 1980: Absorption of atmospheric NO_2 by plants and soils. VI. Transformation of NO_2 absorbed in the leaves and transfer of nitrogen through the plants. Research Report of the National Institute of Environmental Studies (Japan) 11, 51-58.

Kanai, R., Edwards, G., 1999: Biochemistry of C_4 photosynthesis. In: Sage, R.F., Monson, R.K. (eds.): The biology of C_4 photosynthesis. Academic press, New York, 49-87.

Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utraianen, M., Karjalainen, R., 1994: Plant defence systems induced by ozone. Plant Cell Environ. 17, 783-794.

Kanofsky, J.R., Sima, P.D., 1995: Singlet oxygen generation from the reaction of ozone with plant leaves. J. Biol. Chem. 270, 7850-7852.

Khamis, S., Lamaze, T., 1990: Maximal biomass production can occur in corn (*Zea mays*) in the absence of NO_3^- accumulation in either leaves or roots. Physiol. Plant. 78, 388-394.

Kimball, B.A., Mauney, J.R., Nakayama, F.S., Idso, S.B., 1993: Effects of increasing atmospheric CO_2 on vegetation. Vegetatio 104/105, 65-75.

King, B.J., Siddiqi, M.Y., Ruth, T.J., Warner, R.L., Glass, A.D.M., 1993: Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. Plant Physiol. 102, 1279-1286.

Kjeldahl, J., 1883: Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. Z. Anal. Chem. 22, 366-382.

Kleber, H.-P., Schlee, D. 1992: Biochemie II: Spezielle und angewandte Biochemie, 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena.

Kluge, M., 1999: Ökologische Anpassungen: Crassulaceen-Säurestoffwechsel und C_4-Photosynthese. In: Häder, D.-P. (Hrsg.): Photosynthese. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 194-215.

Klumpp, A., Küppers, K., Guderian, R., 1989: Nitrate reductase activity of needles of Norway spruce fumigated with different mixtures of ozone, sulfur dioxide, and nitrogen dioxide. Environ. Poll. 58, 261-271.

Kress, L.W., Skelly, J.M., 1982: Response of several eastern forest tree species to chronic doses of ozone and nitrogen dioxide. Plant Disease 66, 1149-1152.

Kronzucker, H.J., Siddiqi, M.Y., Glass, A.D.M., Kirk, G.J.D., 1999: Nitrate - ammonium synergism in rice. A subcellular flux analysis. Plant Physiol. 119, 1041-1046.

Kumar, P.A., Polisetty, R., Abrol, Y.P., 1993: Interaction between carbon and nitrogen metabolism. In: Abrol, Y.P., Mohanty, P., Govindjee (eds.): Photoreactions to plant productivity. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 339-350.

Lam, H.-M., Coschigano, K.T., Oliveira, I.C., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G.M., 1996: The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47, 569-593.

Latus, C., 1989: Quantitative Untersuchungen zur NO_2-Aufnahme durch Pflanzen aus der Luft - Konstruktion eines Expositionssystems und Ergebnisse an Sonnenblumen (*Helianthus annuus* L.). Berichte des Forschungszentrums Jülich, Nr. Jül.-2326. Forschungszentrum Jülich (KFA), Jülich.

Lea, P.J., Blackwell, R.D., Joy, K.W., 1992:. Ammonia assimilation in higher plants. In: Mengel, K., Pilbeam, D.J. (eds.): Nitrogen metabolism of plants. Clarendon Press, Oxford 1992, 153-185.

Lea, P.J., Wolfenden, J., Wellburn, A.R., 1994: Influence of air pollutants upon nitrogen metabolism. In: Alscher, R., Wellburn A.R. (eds.): Plant responses to the gaseous environment. Chapman & Hall, London, 279-299.

Lee, Y.N., Schwartz, S.E., 1981: Reaction kinetics of NO_2 with liquid water at low particle pressures. J. Physical Chemistry 85, 840-848.

Leegood, R.C., Lea, P.J., Adcock, M.A., Häusler, R.E., 1995: The regulation and control of photorespiration. J. Exp. Bot. 46, 1397-1414.

Leffler, H.R., Cherry, J.H., 1974: Destruction of enzymatic activities of corn and soybean leaves exposed to ozone. Canad. J. Bot. 52, 1233-1238.

Lendzian, K.J., Kerstiens, G., 1991: Sorption and transport of gases and vapors in plant cuticles. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 121, 65-128.

Lindberg, S.E., Bredemeier, M., Schaefer, D.A., Qi, L., 1990: Atmospheric concentrations and deposition of N compounds and major ions during the growing season in conifer forests in the United States and West Germany. Atmos. Environ. 24A, 2207-2220.

Lowry, H.O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Lyons, T.M., Barnes, J.D., 1998: Influence of plant age on ozone resistance in *Plantago major*. New Phytol. 138, 83-89.

Lyons, T., Ollerenshaw, J.H., Barnes, J.D., 1999: Impacts of ozone on *Plantago major*: apoplastic and symplastic antioxidant status. New Phytol. 141, 253-263.

Magalhães, J.R., Ju, G.C., Rich, P.J., Rhodes, D., 1990: Kinetics of $^{15}NH_4^+$ assimilation in *Zea mays*. Plant Physiol. 94, 647-656.

Manderscheid, R., Bender, J., Weigel, H.-J., Jäger, H.-J., 1991: Low doses of ozone affect nitrogen metabolism in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. Biochem. Physiol. Pflanzen 187, 283-291.

Manderscheid, R., Jäger, H.-J., Kress, L.W., 1992: Effects of ozone on foliar nitrogen metabolism of *Pinus taeda* L. and implications for carbohydrate metabolism. New Phytol. 121, 623-633.

Mansfield, T.A., Pearson, M., Atkinson, C.J., Wookey, P.A., 1993: Ozone, sulphur dioxide and nitrogen oxides: some effects on the water relatiopns of herbaceous plants and trees. In: Jackson, M.B., Black, C.R. (eds.): Interacting stresses on plants in a changing climate. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 77-88.

McKee, I.F., Bullimore, J.F., Long, S.P., 1997: Will elevated CO_2 concentrations protect the yield of wheat from O_3 damage? Plant, Cell and Environ. 20, 77-84.

Meier, G. 1986: Emissionsspektrometrische N-15 Analytik. Isotopenpraxis 22, 181-185.

Meinzer, F.C., Zhu, J., 1998: Nitrogen stress reduces the efficiency of the C_4 CO_2 concentrating system, and therefore quantum yield, in *Saccharum* (sugarcane) species. J. Exp. Bot. 49, 1227-1234.

Melo-Oliveira, R., Oliveira, I.C., Coruzzi, G.M., 1996: *Arabidopsis* mutant analysis and gene regulation define a non-redundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 93, 4718-4723.

Miflin, B.J., Lea, P.J., 1977: Amino acid metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 299-329.

Miller, J.D., Arteca, R.N., Pell, E.J., 1999: Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidosis*. Plant Physiol. 120, 1015-1023.

Mohr, H. Schopfer, P., 1992: Pflanzenphysiologie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Morikawa, H., Higaki, A., Nohno, M., Takahashi, M., Kamada, M., Nakata, M., Toyohara, M., Okamura, Y., Matsui, K., Kitani, S., Fujita, K., Irifune, K., Goshima, N., 1998: More than 600-fold variation in nitrogen dioxide assimilation among 217 plant taxa. Plant Cell Environ. 21, 180-190.

Mudd, J.B., 1996: Biochemical basis for the toxicity of ozone. In: Yunus, M., Iqbal, M. (eds.): Plant response to air pollution. John Wiley & Sons Ltd, 267-283.

Mulchi, C.L., Slaughter, L., Saleem, M., Lee, E.H., Pausch, R., Rowland, R., 1992: Growth and physiological characteristics of soybean in open-top chambers in response to ozone and increased atmospheric CO_2. Agriculture, Ecosystems and Environment 38, 107-118.

Mulholland, B.J., Craigon, J., Black, C.R., Colls, J.J., Atherton, J., Landon, G., 1997: Effects of elevated carbon dioxide and ozone on the growth and yield of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Exp. Bot. 48, 113-122.

Näsholm, T., Ericsson, A., 1990: Seasonal changes in amino acids, protein and total nitrogen in needles of fertilized Scots pine trees. Tree Physiol. 6, 267-281.

Nelson, T., Langdale, J.A., 1992: Developmental genetics of C_4 photosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43, 25-47.

Niewiadomska, E., Gaucher-Veilleux, C., Chevrier, N., Maufette, Y., Dizengremel, P., 1999: Elevated CO_2 does not provide protection against ozone considering the activity of several antioxidant enzymes in the leaves of sugar maple. J. Plant Physiol. 155, 70-77.

Nobel, P.S., 1991: Achievable productivities of certain CAM plants: basis for high values compared with C_3 and C_4 plants. New Phytol. 119, 183-205.

Nordin, A., Näsholm, T., 1997: Nitrogen storage forms in nine boreal understorey plant species. Oecologia 110, 487-492.

Oaks, A., 1994a: Efficiency of nitrogen utilization in C_3 and C_4 cereals. Plant Physiol. 106, 407-414.

Oaks, A., 1994b: Primary nitrogen assimilation in higher plants and ist regulation. Can. J. Bot. 72, 739-750.

Oaks, A., 1995: Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: reply. Can. J. Bot. 73, 1116-1117.

Oehmichen, J., 1986: Chemie für Landwirte. 2. überarb. Aufl., Verlag M. + H. Schaper, Hannover.

Ojanperä, K., Pätsikka, E., Yläranta, T., 1998: Effects of low ozone exposure of spring wheat on net CO_2 uptake, Rubisco, leaf senescence and grain filling. New Phytol. 138, 451-460.

Okano, K., Totsuka, T., 1986: Absorption of nitrogen dioxide by sunflower plants grown at various levels of nitrate. New Phytol. 102, 551-562.

Okano, K., Machida, T., Totsuka, T., 1988: Absorption of atmospheric NO_2 by several herbaceous species: Estimation by the ^{15}N dilution method. New Phytologist 109, 203-210.

Oliveira, I.C., Lam, H.-M., Coschigano, K., Melo-Oliveira, R., Coruzzi, G., 1997: Molecular-genetic dissection of ammonium assimilation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry 35, 185-198.

Oliver, D.J., Neuburger, M., Bourguignon, J., Douce, R., 1990: Glycine metabolism by plant mitochondria. Physiol. Plant. 80, 487-491.

Padgett, P.E., Leonard, R.T., 1996: Free amino acid levels and the regulation of nitrate uptake in maize cell suspension cultures. J. Exp. Bot. 47, 871-883.

Pahlich, E., 1996: Remarks concerning the dispute related to the function of plant glutamate dehydrogenase: Commentary. Can. J. Bot. 74, 512-515.

Paludan-Müller, G., Saxe, H., Leverenz, J.W., 1999: Responses to ozone in 12 provenances of European beech (*Fagus sylvatica*): genotypic variation and chamber effects on photosynthesis and dry-matter partitioning. New Phytol. 144, 261-273.

Pausch, R.C., Mulchi, C.L., Lee, E.H., Meisinger, J.J., 1996: Use of ^{13}C and ^{15}N isotopes to investigate O_3 effects on C and N metabolism in soybeans. 2. Nitrogen uptake, fixation, and partitioning. Agriculture Ecosystems & Environment 60, 61-69.

Pell, E.J., Winner, W.E., Vinten Johansen, C., Mooney, H.A., 1990: Response of radish to multiple stresses. I. Physiological and growth responses to changes in ozone and nitrogen. New Phytol. 115, 439-446.

Pell, E.J., Dann, M.S., 1991: Multiple stress-induced foliar senescence and implications for whole-plant longvity. In: Mooney, H.A., Winner, W.E., Pell, E.J. (eds.): Response of plants to multiple stresses. Academic Press, San Diego, 189-204.

Pell, E.J., Eckhardt, N., Glick, R.E., 1994: Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthetic potential. Photosynth. Res. 39, 453-462.

Pell, E.J., Schlagnhaufer, C.D., Arteca, R.N., 1997: Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. Physiol. Plant. 100, 264-273.

Pell, E.J., Sinn, J.P., Brendley, B.W., Samuelson, L., Vinten-Johansen, C., Tien, M., Skillman, J., 1999: Differential response of four tree species to ozone-induced acceleration of foliar senescence. Plant Cell Environ. 22, 779-790.

Pilbeam, D.J., Kirkby, E.A., 1992: Some aspects of utilization of nitrate and ammonium by plants. In: Mengel, K., Pilbeam, D.J. (eds.): Nitrogen metabolism in plants. Clarenden Press, Oxford 1992, 55-70.

Pleijel, H., Skärby, G., Wallin, G., Sellden, G., 1991: Yield and grain quality of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Drabant) exposed to different concentrations of ozone in open-top chambers. Environ. Pollut. 69, 151-168.

Polidoros, A.N., Scandalios, J.G., 1999: Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). Physiol. Plant. 106, 112-120.

Polle, A., Pfirrmann, T., Chakrabati, S., Rennenberg, H., 1993: The effects of enhanced CO_2 and enhanced O_3 concentrations on biomass, pigments and antioxidative enzymes in spruce needles (*Picea abies* [L.] Karst.). Plant Cell Environ. 16, 311-316.

Polle, A., 1997: Defense against photooxidative damage in plants. In: Scandalios, J. (Hrsg.): Oxidative stress and the molecular biology of antioxidants defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 623-666.

Poppe, D., 1993: Photochemische Ozonbildung in der Troposphäre. In: Atmosphärisches Ozon: Prozesse und Wirkungen. Vortragsveranstaltung der Arbeitsgemeinschaft der Großforschungseinrichtungen (AGF), 6. Dezember 1993, Bonn-Bad Godesberg, 5-6.

Raab T.K., Terry, N., 1994: Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. Plant Physiol. 105, 1159-1166.

Ramge, P., Badeck, F.-W., Plöchl, M., Kohlmeier, G.H., 1993: Apoplastic antioxidants as decisive elimination factors within the uptake process of nitrogen dioxide into leaf tissues. New Phytologist 125, 771-785.

Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., 1996: Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 110, 125-136.

Reddy, G.N., Arteca, R.N., Dai, Y.-R., Flores, H.F., Negm, F.B., Pell, E.J., 1993: Changes in ethylene and polyamines in relation to mRNA levels of the large and small subunits of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase in O_3 stressed potato foliage. Plant Cell Environ. 16, 819-826.

Reid, C.D., Fiscus, E.L., Burkey, K.O., 1998: Combined effects of chronic ozone and elevated CO_2 on Rubisco activity and leaf components in soybean (*Glycine max*). J. Exp. Bot. 49, 1999-2011.

Robinson, S.A., Slade, A.P., Fox, G.G., Phillips, R., Ratcliffe, R.G., Stewart, G.R., 1991: The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. Plant Physiol. 95, 509-516.

Robinson, S.A., Stewart, G.R., Philips, R., 1992: Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein metabolism in carrot cell suspension cultures. Plant Physiol. 98, 1190-1195.

Robinson, M.F., Heath, J., Mansfield, T.A., 1998: Disturbances in stomatal behaviour caused by air pollutants. J. Exp. Bot. 49, 461-469.

Rogers, H.H., Campbell, J.C., Volk, R.J., 1979: Nitrogen-15 dioxide uptake and incorporation by *Phaseolus vulgaris* (L.). Science 206, 333-335.

Rogers, H.H., Dahlmann, R.C., 1993: Crop responses to CO_2 enrichment. Vegetatio 104/105, 117-131.

Rosén, K., Gundersen, P., Tenghammar, L., Johansson, M., Frogner, T., 1992: Nitrogen enrichment in nordic forest ecosystems. Ambio 21, 364-368.

Rowland, A.J., Borland, A.M., Lea, P.J., 1988: Changes in amino acids, amines, and proteins in response to air pollutants. In: Schulte-Hostede, S., Darrall, N.M., Blank, L.W., Wellburn, A.R. (eds.): Air pollution and plant metabolism. Elsevier, London, 189-221.

Rufty, T.W. Jr., MacKown, C.T., Volk, R.J., 1990: Alterations in nitrogen assimilation and partitioning in nitrogen stressed plants. Physiol. Plant. 79, 85-95.

Saarinen, T., 1998. Internal C:N balance and biomass partitioning of *Carex rostrata* grown at three levels of nitrogen supply. Can. J. Bot. 76, 762-768.

Sage, R.F., Pearcy R.W. (1987): The nitrogen use efficiency of C_3 and C_4 plants. II. Leaf nitrogen effects on the gas exchange characteristics of *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). Plant Physiol. 84, 959-963.

Salsac, L., Chaillou, S., Morot-Gaudry, J.-F., Lesaint, C., Jolivet, E., 1987: Nitrate and ammonium nutrition in plants. Plant Physiol. Biochem. 25, 805-812.

Salter, L., Hewitt, C.N., 1992: Ozone-hydrocarbon interactions in plants. Phytochemistry 31, 4045-4050.

SANA, 1992: Ein Projekt zur Sanierung der Atmosphäre über den neuen Bundesländern. IFU -Fraunhofer Institut für Atmosphärische Umweltforschung Garmisch-Partenkirchen (Hrsg.).

Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W., Langebartels, C., 1998: Ozone as abiotic elicitor of plant defence reaction. Trends in Planta Science 3, 47-50.

Scheible, W.-R., Lauerer, M., Schulze, E.-D., Caboche, M., Stitt, M., 1997: Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. The Plant J. 11, 671-691.

Schlee, D., 1991: Wirkung von Luftschadstoffen auf den pflanzlichen Organismus. Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 362-367.

Segschneider, H.-J., 1994: Untersuchungen zur Aufnahme und zum Einbau von anthropogenen Stickoxiden (NO_x) durch Sonnenblumen und Mais mittels ^{15}N-Isotopen-Markierung. Berichte des Forschungszentrums Jülich, Nr. Jül.-2903. Forschungszentrum Jülich (KFA), Jülich.

Segschneider, H.J., 1995: Auswirkungen atmosphärischer Stickoxide (NO_x) auf den pflanzlichen Stoffwechsel: Eine Literaturübersicht. Angew. Bot. 69, 60-85.

Sgarbi, E., Medeghini Bonatti, P., Baroni Fornasiero, R., 1999: Differential sensitivity to ozone in two selected cell lines from grape leaf. J. Plant Physiol. 154, 119-126.

Shargool, P.D., Jain, J.C., 1989: Purification and immunological properties of an NAD(H) dependent glutamat dehydrogenase from soybean cells (*Glycine max L.*). Plant Science 60, 173-179.

Shargool, P.D., Bhadula, S.K., Jain, J.C., 1991: Glutamate dehydrogenase: its properties and synthesis in plants and in plant cell cultures. Plant Physiol. (Life Sci. Adv.) 10, 1-5.

Shimazaki, K., Yu, S.-W., Sakaki, T., Tanaka, K., 1992: Differences between spinach and and kidney bean plants in terms of sensitivity to fumigation with NO_2. Plant Cell Physiol. 33, 267-273.

Skärby, L., Sellden, G., Mortensen, L., Bender, J., Jones, M., DeTemmerman, L., Wenzel, A., Fuhrer, J., 1993: Responses of cereals exposed to air pollutants in open-top chambers. In: Jäger, H.J., Unsworth, M., DeTemmerman, L., Mathy, P. (eds.): Effects of air pollution on agricultural crops in Europe. Air Poll. Research Report 46, 241-259.

Slack, C.R., Hatch, M.D., 1967: Comparative studies on the activity of carboxylase and other enzymes in relation to the new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in tropical grasses. Biochem. J. 103, 660-665.

Slovik, S., 1996: Chronic SO_2 and NO_x pollution interferes with the K^+ and Mg^{2+} budget of Norway spruce trees. J. Plant Physiol. 148, 276-286.

Sonntag, H.-W., Mahn, E.G., 1998: Untersuchungen zum Einfluß unterschiedlich hohen N-Angebotes und verschiedener Nutzungsintensität auf den Gehalt einzelner Aminosäuren ausgewählter Segetalarten unter Agrarsystembedingungen. Angew. Bot. 72, 99-106.

Srivastava, H.S., Ormrod, D.P., 1984: Effects of nitrogen dioxide and nitrate nutrition on growth and nitrate assimilation in bean leaves. Plant. Physiol. 76, 418-423.

Srivastava, H.S., Ormrod, D.P., 1989: Nitrogen dioxide and nitrate nutrition effects on nitrate reductase activity and nitrate content of bean leaves. Environmental and Experimental Botany 29, 433-438.

Srivastava, H.S., Singh, R.P., 1987: Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity of higher plants. Phytochemistry 26, 597-610.

Stitt, M., 1991: Rising CO_2 levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. Plant Cell Environ. 14, 741-762.

Stockwell, W.R., Kramm, G., Scheel, H.-E., Mohnen, V.A., Seiler, W., 1997: Ozone formation, destruction and exposure in Europe and the United States. In: Sandermann, H., Wellburn, A.R., Heath, R.L. (eds.): Forest decline and ozone. Ecological studies, vol. 127. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1-38.

Stulen, I., Ter Stege, M., 1995: Light and nitrogen assimilation. In: Srivastava, H.S., Singh, R.P. (eds.): Nitrogen Nutrition in higher plants. Associated Publishing, New Delhi, India, 367-384.

Tapia, M.I., Ochoa de Alda, J.A.G., llama, M.J., Serra, J.L., 1996: Changes in intracellular amino acids and organic acids induced by nitrogen starvation and nitrate or ammonium resupply in the cyanobacterium *Phormidium laminosum* . Planta 198, 526-531.

Thoene, B., Rennenberg, H., Weber, P., 1997: Absorption of atmospheric NO_2 by spruce (*Picea abies*) trees. 2. Parameterization of NO_2 fluxes by controlled dynamic chamber experiments. New Phytologist 134, 257-266.

Tingey, D.T., Fites, R.C., Wickliff, C., 1973: Ozone alteration of nitrate reduction in soybean. Physiol. Plant. 29, 33-38.

Tischner, R., Peuke, A., Godbold, G.L., Feig, R., Merg, G., Hüttermann, A., 1988. The effect of NO_2-fumigation on aseptically grown spruce seedlings. J. Plant Physiology 133, 243-246.

Tischner, R., 1994: Characteristics of nitrate uptake in higher and lower plants. Nova Acta Leopoldina NF 70, Nr. 288, 29-38.

UBA (Umweltbundesamt), 1990: Luftverschmutzung durch Stickoxide: Ursachen, Wirkungen, Minderungen (Red. B. Schäfer). Berichte 3/90, Erich Schmitt-Verlag, Berlin.

UBA (Umweltbundesamt), 1999: Daten im Internet über http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-daten.

Ullrich, W.R., 1992: Transport of nitrate and ammonium through plant membranes. In: Alscher, R., Wellburn A.R. (eds.): Plant responses to the gaseous environment. Chapman & Hall, London, 121-137.

Van der Eerden, L.J., de Visser, P., Pérez-Soba, M., 1998: Urban and agricultural nitrogen deposition: are there differences in impact? In: De Kok, L.J., Stulen, I. (eds.): Responses of plant metabolism to air pollution and global change. Leiden, the Netherlands, Backhuys Publishers, 469-471.

VDI (Verein Deutscher Ingenieure), 1989: Maximale Immissionskonzentrationen für Ozon. VDI 2310, Blatt 6.

Volin, J.C., Reich, P.B., 1996: Interaction of elevated CO_2 and O_3 on growth, photosynthesis and respiration of three perennial species grown in low and high nitrogen. Physiol. Plant. 97, 674-684.

Volin, J.C., Reich, P.B., Givnich, T.J., 1998: Elevated carbon dioxide ameliorates the effects of ozone on photosynthesis and growth: species respond similarly regardless of photosynthetic pathway or plant functional group. New Phytol. 138, 315-325.

Vontiedemann, A., 1996: Single and combined effects of nitrogen fertilization and ozone on fungal leaf diseases on wheat. J. Plant Diseases and Protection 103, 409-419.

Watson, R.T., Rodhe, H., Oeschegerm, H., Siegenthaler, U., 1990: Greenhouses gases and aerosols. In: Houghton, T.J., Jenkins, G.J., Ephraums, J.J. (eds.): Climate change. The IPCC Scientific Assessment. Cambridge University Press, Cambridge, 1-40.

Weatherburn, M.W., Schmidt, S., Schuster, C., Mohr, H., 1967: Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. 39, 971-974.

Weber, P., Nußbaum, S., Fuhrer, J., Schlunegger, U.P., Brunold, C., Rennenberg, H., 1995: Uptake of atmospheric $^{15}NO_2$ and ist incorporation into free amino acids in wheat (*Triticum aestivum*). Physiol. Plant. 94, 71-77.

Weber, P., Rennenberg, H., 1996: Dependency of nitrogen dioxide (NO_2) fluxes to wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves from NO_2 concentration, light intensity, temperature and relative humidity determined from controlled dynamic chamber experiments. Atmospheric Environment 30, 3001-3009.

Weigel, H.J., Jäger, H.-J., 1988: Zur Ökotoxikologie von Luftschadstoffen. II. Aufbau und Funktionsweise einer Expositionsanlage aus open-top Kammern zur Untersuchung von Immissionswirkungen auf Pflanzen. Landbauforschung Völkenrode 38, 182-195.

Wellburn, A.R., Wilson, J., Aldridge, P.H., 1980: Biochemical responses to nitric oxide polluted atmospheres. Environ. Poll. 22, 219-228.

Wellburn, A.R., Higginson, C., Robinson, D., Walmsley, C., 1981: Biochemical explanation of more than additive inhibitory effects of low atmosphere levels of $SO_2 + NO_2$ upon plants. New Phytologist 88, 223-237.

Wellburn, A.R., 1990: Why are atmospheric oxides of nitrogen usually phytotoxic and not alternative fertilizers? New Phytologist 115, 395-429.

Wellburn, F.A.M., Lau, K.K., Milling, P.M.K., Wellburn, A.R., 1996: Drought and air pollution affect nitrogen cycling and free radical scavenging in *Pinus halepensis* (Mill.). J. Exp. Bot. 47, 1361-1367.

WHO, 1997: Environmental Health Criteria 188: Nitrogen oxides (2nd edition). World Health Organisation, Genf.

Wieser, G., Havranek, W.M., 1993: Ozone uptake in the sun and shade crown of spruce: Quantifying the physiological effects of ozone exposure. Trees 7, 227-232.

Wieser, G., Havranek, W.M., Loidoldt-Nagele, M., Kronfuß, G., Polle, A., 1998: Responses of photosynthesis, carbohydrates and antioxidants in needles of Norway spruce to slow and rapid changes in ozone. Bot. Acta 111, 35-41.

Wilson, E.J., Skeffington, R.A., 1994: The effects of of excess nitrogen deposition on young Norway spruce trees. Part I. The soil. Environ. Poll. 86, 141-151.

Wingsle, G., Näsholm, T., Lundmark, T., Ericsson, A., 1987: Induction of nitrate reductase in needles of scots pine seedlings by NO_x and NO_3^-. Physiol. Plant. 70, 399-403.

Yamaya, T., Oaks, A., Matsumoto, H., 1984: Characteristics of glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots. Plant Physiol. 76, 1009-1013.

Yoneyama, T., Sasakawa, H., Ishizuka, S., Totsuka, T., 1979: Absorption of atmospheric NO_2 by plants and soils II. Nitrite accumulation, nitrite reductase activity and diurnal change of NO_2 absorption in leaves. Soil Sci. Plant Nutr. 25, 267-275.

Yoneyama , T., Yasuda, T., Yazaki, J., Totsuka, T., 1980a: Absorption of atmospheric NO_2 by plants and soils. VII. NO_2 absorption by plants, re-evaluation of the air-soil-root route. Research Report of the National Institute of Environmental Studies (Japan) 11, 59-67.

Yoneyama, T., Totsuka, T., Hayakawa, N., Yazaki, J., 1980b: Absorption of atmospheric NO_2 by plants and soils. V. Day and night NO_2-fumigation effect on the plant growth and estimation of the amount of NO_2-nitrogen absorbed by plants. Research Report of the National Institute of Environmental Studies (Japan) 11, 31-47.

Yu, S.-W., Li, L., Shimazaki, K.-I., 1988: Response of spinach and kidney beans to nitrogen dioxide. Environ. Poll. 11, 97-108.

Zeevaart, A.J., 1976: Some effects of fumigating plants for short with NO_2. Environ. Poll. 11, 97-108.

Ziegler, H., 1995: Weg der Schadstoffe in der Pflanze. In: Hock, B., Elstner, E.F. (eds.): Schadwirkungen auf Pflanzen. Lehrbuch der Pflanzentoxikologie. 3. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 53-64.

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle/Saale, den 12.01.2000

Doreen Möcker

(Doreen Möcker)

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. G.-J. Krauß vom Fachbereich Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle und bei Herrn PD Dr. K. Jung vom Umweltforschungszentrum Leipzig für die außerordentlich engagierte wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, für ihr unermüdliches Interesse am Fortgang der Forschungsarbeiten und die jederzeit gewährte Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. D. Schlee, der mein Interesse für das Fachgebiet der Ökologischen Pflanzenbiochemie geweckt und meine Arbeiten bis zu seinem unerwarteten frühzeitigen Tod im August 1994 in hervorragender Weise fachlich begleitet hat.

Den Mitarbeitern der Pflanzenbiochemischen Abteilung des Fachbereiches Biochemie/Biotechnologie, besonders aber Herrn Dr. H. Tintemann, Frau H. Pechfelder und Frau E. Hoffart, danke ich für zahlreiche wertvolle Hinweise und die angenehme und produktive Zusammenarbeit.

Bei Frau I. Sobotta, Frau R. Brinkmann und Frau Dr. D. Hofmann sowie bei allen anderen Mitarbeitern der Sektion Chemische Ökotoxikologie des Umweltforschungszentrums Leipzig möchte ich mich für die praktische Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. H. Schulz und seinen Mitarbeitern für die Unterstützung bei der Durchführung der HPLC-Analysen.

Eine wesentliche Vorraussetzung für das Gelingen dieser Arbeit waren die wertvollen Kooperationen mit Forschungsgruppen der FAL Braunschweig und des Forschungszentrums Jülich. Mein besonderer Dank gilt daher Dr. J. Bender von der FAL Braunschweig für die Durchführung der Ozonexpositionen und Dr. H. Förstel vom Institut für Radioagronomie des Forschungszentrums Jülich für die Ermöglichung der $^{15}NO_2$-Begasungsexperimente.

An dieser Stelle möchte ich mich auch herzlich bei meinen Freunden, bei Dir, Elmar, und ganz besonders bei Euch, meinen Eltern, für die unermüdliche moralische und praktische Unterstützung bedanken.

Angaben zur Person

Persönliche Daten

Name:	Doreen Möcker
Geburtstag und -ort:	05.10.1969 in Neindorf-Beckendorf
Adresse:	Lerchenbergstraße 28/5 in 73733 Esslingen
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1976 - 1986	Polytechnische Oberschule Halle-Neustadt
1986 - 1988	Erweiterte Oberschule Halle-Neustadt, Abitur „mit Auszeichnung" bestanden

Studium und wissenschaftlicher Werdegang

1988 - 1993	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie
1992	Diplomprüfungen in den Fächern Biochemie (Hauptfach), Organische Chemie, Mikrobiologie, Ökologische Biochemie
1992 - 1993	Anfertigung der Diplomarbeit in der Abteilung Allgemeine und Pflanzenbiochemie unter Leitung von Professor Dr. D. Schlee Thema: „Wirkungen luftgetragener Schadstoffe auf die Glutaminsynthetase aus Nadeln von *Pinus sylvestris* und aus Gräsern eines Halbtrockenrasens"
10.09.1993	Abschluß des Studiums als Diplom-Biochemikerin durch öffentliche Verteidigung der Diplomarbeit Diplomarbeit mit „gut" bewertet, Gesamtprädikat „gut"
01.10.1993- 28.02.1997	Doktorandin in der Abteilung Allgemeine und Pflanzenbiochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Bearbeitung des Projektes: „Enzyme des Stickstoffmetabolismus und natürliche Isotopenvariationen des Stickstoffs zur Frühdiagnostik von Schadwirkungen in pflanzlichen Systemen" in Zusammenarbeit mit dem Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle mit dem Ziel der Promotion Betreuer: Dr. habil. K. Jung (Umweltforschungszentrum) Prof. Dr. G.-J. Krauß (Universität Halle)
01.03.1997- 31.07.1997	Beschäftigung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am UFZ Leipzig, Sektion Chemische Ökotoxikologie, Abteilung Angewandte Phytotoxikologie
15.03.1998- 10.04.1999	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Forschungsgebiet: Cholesterintransport in der Pflanzenzelle
seit 01.09.1999	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart; Forschungsgebiet: Regulation der Zellteilung bei Hefen

Esslingen, den 09.01.2000 Doreen Möcker

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Sektion Chemische Ökotoxikologie
Permoserstraße 15
D-04318 Leipzig
Telefon 0341/235-2309
Telefax 0341/235-2401