

**Physiologie und Ultrastruktur der antarktischen
Grünalge *Prasiola crispa* ssp. *antarctica* unter
osmotischem Streß und Austrocknung**

**Physiology and Ultrastructure of the Antarctic
Green Alga *Prasiola crispa* ssp. *antarctica*
subjected to osmotic stress and desiccation**

Andreas Jacob

**Ber. Polarforsch. 102 (1992)
ISSN 0176 - 5027**

Andreas Jacob
Universität Bremen
Fachbereich Biologie / Meeresbotanik
2800 Bremen 33
Bundesrepublik Deutschland

Die vorliegende Arbeit ist die inhaltlich unveränderte Fassung einer Dissertation, die 1991 am Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen angefertigt wurde. Der Titel dieser Dissertation lautet:
"Cytologische und ökophysiologische Untersuchungen zur osmotischen Resistenz und Austrocknungstoleranz bei *Prasiola crispa* ssp. *antarctica* (Kützing) Knebel".

Inhaltsverzeichnis

Summary (Zusammenfassung)	7(8)
1. Einleitung	
1.1. Osmotischer Streß und Austrocknung bei Algen	9
1.2. <i>Prasiola crispa</i>	11
1.3. Zur vorliegenden Arbeit	14
2. Material und Methoden	
2.1. Algenmaterial	15
2.2. Allgemeine Methoden	15
2.2.1. Kulturbedingungen	
2.2.2. Kultur- und Versuchsmedien	
2.2.3. Bestimmung der Frischgewichte (Fg und SFg)	
2.2.4. Bestimmung der Trockengewichte (Tg, Tr und org. Tr)	
2.2.5. Bestimmung der Wachstumsraten (RGR und WR)	
2.2.6. Berechnung von Zell- und Protoplastenvolumen	
2.2.7. Vitalfärbungen	
2.2.8. Extraktion	
2.2.9. Ionenanalyse	
2.2.10. Analyse der organischen Inhaltsstoffe	
2.2.11. Berechnung des extrazellulären Raumes (ECS)	
2.2.12. Dichtebestimmungen bei Medien und Thalli	
2.2.13. Bestimmung der Osmolarität von Kulturmedien	
2.2.14. Messung der Thallusdehnung nach osmotischem Schock	
2.2.15. Messung der Photosynthese und Atmungsraten	
2.3. Methoden für die Elektronenmikroskopie	25
2.3.1. Präparation	
2.3.2. Fixierung mit Aldehyd	
2.3.3. Fixierung mit Osmiumtetroxid (OsO ₄)	
2.3.4. Blockkontrastierung mit Uranylacetat	
2.3.5. Enzymbehandlung mit Pektinase und Pektinesterase	
2.3.6. Entwässerung	
2.3.7. Einbettung	
2.3.8. Ultradünnschnitte	
2.3.9. Nachkontrastierung	
2.3.10. Gefrierbrüche	
2.3.11. Elektronenmikroskopie	
2.3.12. EELS-Technik	
2.3.13. Testserie zum Kontrastverlust	
2.4. Statistik	30
3. Ergebnisse	
<u>3.1. Versuche mit unterschiedlichen Salinitäten</u>	
3.1.1. Thallus-Morphologie und Langzeitversuche	31
3.1.2. Physiologie	32
3.1.2.1. Wachsraten (WR)	
3.1.2.2. Wassergehalt	
3.1.2.3. Analyse der Inhaltsstoffe	
3.1.2.4. Photosynthese und Atmung	
3.1.2.5. Thallusdehnung unter osmotischem Streß	
3.1.2.6. Regulation des Thallusvolumens	

3.1.3. Ultrastruktur	48
3.1.3.1. Ultrastruktur in der Normalkultur	
3.1.3.2. Ultrastruktur unter Salzstreß	
3.1.3.3. Strukturänderungen in der Nachkultur	
3.1.3.4. Elementnachweis mit EDXA und EELS-Technik	
3.1.3.5. Qualität der elektronenmikroskopischen Präparation	
<u>3.2. Versuche zur Austrocknung</u>	
3.2.1. Physiologie	65
3.2.1.1. Austrocknung der Thalli	
3.2.1.2. Wuchsraten	
3.2.1.3. Photosynthese und Atmung während der Austrocknung	
3.2.1.4. Photosynthese und Atmung nach Wiederbenetzung	
3.2.2. Ultrastruktur	71
<u>3.3. Einfluß der Bleikontrastierung auf die Globuli</u>	74
4. Diskussion	
<u>4.1. Versuche mit unterschiedlichen Salinitäten</u>	
4.1.1. Physiologie	79
4.1.1.1. Wuchsraten	
4.1.1.2. Photosynthese und Atmung	
4.1.1.3. Wassergehalt und Chlorophyllgehalt	
4.1.1.4. Ionen und organische Osmotika	
4.1.1.5. Osmot. Schock und Turgorregulation	
4.1.2. Ultrastruktur	95
4.1.2.1. Vakuolen	
4.1.2.2. Chloroplasten	
<u>4.2. Versuche zur Austrocknung</u>	
4.2.1. Physiologie	98
4.2.1.1. Austrocknung	
4.2.1.2. Photosynthese und Atmung	
4.2.1.3. Wuchsraten	
4.2.2. Ultrastruktur	102
4.2.3. Zellwand und Globuli	103
<u>4.3. Zusammenfassung und Schlußfolgerung</u>	103
5. Literaturverzeichnis	107
Danksagungen	121
Anhang 1 Rezepte für den Methodenteil	122
Anhang 2 Firmennachweise	128
Anhang 3 Tabellen zu den Grafiken	130
Anhang 4 Angaben zu den Abbildungen	141
Verzeichnis der Abkürzungen	143

Summary

The physiological and ultrastructural responses to both osmotic and desiccation stress were investigated in the antarctic green alga *Prasiola crispa* ssp. *antarctica* (Kützing) Knebel.

Following 14 days of hypoosmotic culture (0.35‰ and 17‰) rates of growth, photosynthesis and dark respiration remained almost unchanged. Similarly the intracellular ionic content was little affected, and the organic osmolyte content was only slightly reduced. Turgor pressure increased up to ca. 2,1 MPa, but the strong cell walls prevented the cells from rupturing. No obvious change in ultrastructure was seen.

The single chloroplast occupied most of the protoplast volume. After prolonged periods of hypoosmotic treatment (1 to 3 months) the numerous starch granules in the chloroplast became larger. No obvious damage could be seen after hypoosmotic cultivation for several months, or after returning such cultures back to control media (35‰).

14 days cultivation in hypersaline media (70‰ and 175‰) resulted in a decrease of growth, photosynthesis and dark respiration. After transfer back to 35‰ these parameters quickly returned to control rates.

The inorganic ion content increased under salinity stress (mainly K^+ and HPO_4^{2-} , to a lesser extent Na^+ , NH_4^+ and Cl^-), and reached their highest values in 70‰ media. The contents of Ca^{2+} and Mg^{2+} remained unchanged. Organic osmolytes (mainly sorbitol) showed highest intracellular concentrations in 175‰. At all salinities the cells contained about 100 $\mu\text{mol/g}$ freshweight free amino-acids, the portion of proline was 30 - 50%.

After 1-2 days in 70‰ media vacuoles in the cytoplasm were visible, whilst their occurrence took 1 week in 175‰. The starch granules in the chloroplasts were degraded slowly, presumably the degradation was faster in 175‰ than in 70‰. After 2-3 month of hyperosmotic treatment no starch granules were left. The thalli died after 3 - 5 months (175‰ and 70‰ resp.).

Photosynthesis and dark respiration declined immediately after emersion and rates were restored soon after reimmersion. Thalli survived 14 days of storage in 50% rel. humidity, but the growth rate in the following culture was reduced. Besides the loss of water, there is some evidence for an separate influence of the desiccation time on growth rate. If the water loss was not greater than 90% of total cell water no obvious damage occurred.

The ultrastructure of the cells, especially the membranes, were apparently not injured by water loss. The outer cell walls have a "false cuticle", which is obviously deposited from lipophilic globules in the cytoplasm.

The measured physiological and ultrastructure parameters and their relevance to the antarctic habitat is discussed.

Zusammenfassung

An der antarktischen Grünalge *Prasiola crispa* ssp. *antarctica* (Kützing) Knebel wurden die physiologischen Reaktionen auf osmotischen Streß und Austrocknung im Vergleich zu ultrastrukturellen Veränderungen untersucht.

Nach 14-tägiger Kultur in erniedrigten Salinitäten (0,35‰ bis 35‰) zeigten sich relativ unveränderte Raten für Wachstum, Photosynthese und Atmung. Die intrazellulären Ionengehalte blieben fast konstant, die organischen Osmotika waren etwas reduziert. Der Turgor stieg dabei auf ca. 2,1 MPa, Zellschäden wurden aber durch die dicken Zellwände verhindert. Auch in der Ultrastruktur waren keine deutlichen Veränderungen sichtbar.

Nach längerer Kulturhaltung wurden im Chloroplasten, der den größten Teil des Protoplasten einnimmt, vermehrt Stärkekörner sichtbar. Eine Schädigung des Thallus trat auch nach mehrmonatiger Kultur oder nach Rückführung in Kontrollbedingungen (35‰) nicht auf.

Bei 14-tägiger Kultur in höheren Salinitäten (35‰ bis 175‰) nahmen Wachstum, Atmung und Photosynthese stark ab; diese Leistungen waren aber nach Rückführung in Kontrollbedingungen schnell wieder normalisiert.

Die Ionengehalte stiegen unter Salzstreß an (hauptsächlich K^+ und HPO_4^{2-} , weniger Na^+ , NH_4^+ und Cl^-) und erreichten die höchsten Werte in 70‰. Die Gehalte an Mg^{2+} und Ca^{2+} blieben unverändert. Die organischen Osmotika (hauptsächlich Sorbit) hatten in 175‰ den höchsten Wert. In allen Salinitäten waren ca. 100 $\mu\text{mol/gFg}$ freie Aminosäuren nachweisbar, davon betrug der Prolin-Anteil 30-50%.

In 70‰ bildeten sich nach wenigen Tagen Vakuolen im Cytoplasma, in 175‰ begann die Vakuolenbildung erst nach 1 Woche. Die Stärke in den Chloroplasten wurde relativ langsam abgebaut, der Abbau war vermutlich in 175‰ etwas schneller als in 70‰. Nach mehrmonatiger Kultur waren keine Stärkekörner mehr nachweisbar, die Thalli starben nach 3 (175‰) bis 5 Monaten (70‰) ab.

Durch die Austrocknung der Thalli von *P. crispa* wurden Photosynthese und Atmung sofort stark reduziert, nach der Wiederbenetzung erholten sich beide rasch. Die Thalli ertrugen 14-tägige Trocknung bei 50% rF, die Wachstumsrate war dann jedoch stark reduziert. Es gab vermutlich einen Einfluß der Trocknungsdauer auf die Wachstumsrate, welcher vom Wasserverlust unabhängig war. Der maximal tolerierte Wasserverlust betrug 90% des Zellwassers.

Die Ultrastruktur der Zellen, insbesondere die Membransysteme, wurden durch den Wasserverlust anscheinend nicht beeinträchtigt. Die Zellwand besitzt eine "falsche Kutikula", die offenbar von lipophilen Globuli im Cytoplasma abgegeben wird.

Die Übereinstimmung von physiologischen Leistungen und Ultrastruktur, sowie der Bezug beider zum antarktischen Habitat werden diskutiert.

1. Einleitung

1.1. Osmotischer Streß und Austrocknung bei Algen

In Abhängigkeit von ihrem Habitat kann eine Alge verschiedenen Salinitäten ausgesetzt sein. Im Sublitoral liegen im allgemeinen sehr ausgeglichene Verhältnisse vor, die Salinität ist dort fast konstant (TAIT, 1971). Je höher im Litoral die Alge wächst, desto stärker werden die Salinitätsschwankungen, denen sie ausgesetzt ist (den HARTOG, 1968). In Gezeitentümpeln steigt durch die Verdunstung des Wassers der Salzgehalt an, bis im Extremfall eine gesättigte Salzlösung entstanden ist. Durch den Eintrag von Regen oder Oberflächenwasser kann es aber auch zu einer Aussüßung des Milieus bis zu Süßwasser-Bedingungen kommen. Diese Schwankungen im Salzgehalt sind im Supralitoral, wo die Alge nur gelegentlich von Salzgischt oder Süßwasser benetzt wird, am stärksten.

Erhöht sich die Salinität des umgebenden Milieus, so bedeutet dies für die darin lebenden Algen eine Erniedrigung des Wasserpotentials. Da die Außenkonzentration aller Ionen erhöht ist, verschieben sich auch die Konzentrationsgradienten zwischen Algenzellen und Außenmilieu. Dies bedeutet einerseits eine stärkere Belastung durch schädliche Ionen (besonders Na^+), andererseits ist auch das Angebot an "nützlichen" Ionen (besonders K^+) erhöht. Selektive Ionenaufnahme durch den Protoplasten kann dabei zu einer Veränderung der internen Ionenverhältnisse führen (KIRST, 1990).

Im Supra- und Eulitoral kommt es durch trockene Witterung oder Ebbe zu einem zeitweisen Trockenfallen der Algen. Durch die Austrocknung wird das Wasserpotential der Algen ebenfalls erniedrigt. In dieser Hinsicht stellen erhöhte Salinität und Austrocknung vergleichbare Stressoren dar (SMITH et al., 1986). Die Ionenkonzentrationen in den Algen steigen durch den Wasserverlust an. Da aber mit der Umgebung kein Ionenaustausch mehr stattfinden kann, bleibt das Konzentrations-Verhältnis der einzelnen Ionen zueinander unverändert.

Bei den Algen kalter Lebensräume kommt das Einfrieren als weiterer, ebenfalls das Wasserpotential erniedrigender Streßfaktor hinzu (DAVEY, 1989). Hier können zusätzlich mechanische Schäden durch Eiskristallbildung auftreten.

Die Fähigkeit einer Alge, die verschiedenen Stressoren zu ertragen oder ihnen gegenzusteuern, begrenzt ihr Habitat (LÜNING; 1985).

Erste Untersuchungen zur osmotischen Toleranz von Algen wurden schon 1938 und 1939 von BIEBL durchgeführt. Seitdem ist der Einfluß verschiedener Salinitäten auf Algen sowohl im Freiland als auch unter Laborbedingungen vielfältig untersucht worden (hierzu ist 1990 ein umfassender Übersichtsartikel von KIRST erschienen). Beliebte Objekte für diese Untersuchungen waren einzellige Algen wie die Gattungen *Tetraselmis* (*Platymonas*) (HELLEBUST, 1976; KIRST, 1977a,b,c), *Chlorella* (MUNNS et al., 1983) oder *Dunaliella* (HAJIBAGHERI et al., 1986). Die letzte Gattung weist extrem halophile Vertreter auf (BROWN & BOROWITZKA, 1979). Sofern diese Algenarten keine Zellwand besitzen, bewirken Salinitätsänderungen eine Veränderung des Zellvolumens durch passiven Wasserein- oder Ausstrom (Osmometerverhalten; KIRST, 1985).

Makroalgen dagegen verfügen über eine Zellwand, in ihren Zellen besteht daher ein Turgordruck. Umfangreiche Untersuchungen an sublitoralen Algen zeigten, daß diese ihren Turgor dem umgebenden Medium anpassen können (HASTINGS & GUTKNECHT, 1976; BISSON & KIRST, 1979; KIRST & BISSON, 1979). Auch bei Algen des Eulitorals wie *Codium decorticatum* (BISSON & GUTKNECHT, 1975) oder *Porphyra umbilicalis* (KNOTH & WIENCKE, 1984; WIENCKE et al., 1984) wurde der Turgordruck (*Codium*) oder das Cytoplasmavolumen (*Porphyra*) nach veränderter Salinität vollständig reguliert. 1983 wurde von REED beobachtet, daß *Polysiphonia lanosa*, eine Alge die im Brackwasser von Flußmündungen wächst, ihren Turgor nur unvollständig regulierte. Diese Fähigkeit, einen durch externe Bedingungen veränderten Turgor längerfristig zu ertragen, ist in der Folgezeit an vielen Algen festgestellt worden. Sie gilt heute als wichtige Anpassung an Standorte mit extremen oder schnell wechselnden Salinitäten (KIRST, 1990). Algen mit unvollständiger Turgorregulation finden sich häufig in Ästuaren (YOUNG et al., 1987b), aber auch im Supralitoral oder an atmophytischen Standorten (KARSTEN & KIRST, 1989b).

Beim osmotischen Schock verändert zunächst ein passiver Wasserstrom Turgor und/oder Volumen der Zellen. Hypoosmotische Schocks führen zu einem Wassereinstrom, was besonders bei wandlosen Zellen zum Zerreißen des Protoplasten führen kann. Umgekehrt schrumpft der Protoplast einer Zelle mit fester Zellwand bei hyperosmotischen Schocks und kann durch eine Plasmolyse beschädigt werden (KIRST, 1985).

Die Turgor- oder Volumenregulation erfolgt über eine aktive Veränderung des osmotischen Potentials in den Zellen. Dadurch wird der Wassergehalt in den Zellen reguliert und die Veränderungen durch den Schock werden kompensiert. Kurzfristig wird das osmotische Potential meist über den Gehalt an anorganischen Ionen reguliert. Diese machen bei vakuolisierten Zellen den überwiegenden Teil des osmotischen Potentials aus und ihr Gehalt kann mit relativ geringem Energieverbrauch schnell und deutlich verändert werden (BISSON & KIRST, 1979). Für die längerfristige Turgorregulation synthetisieren viele Algen niedermolekulare organische Substanzen. Diese liegen vor allem im Cytoplasma vor und sind dort weniger toxisch als anorganische Ionen (KIRST, 1990).

Der Schock und die nachfolgende Regulation können erhebliche Auswirkungen auf die Ultrastruktur der Zellen haben (TREZZI et al., 1965). Diese stehen im engen Zusammenhang mit den physiologischen Veränderungen in den Zellen, sind aber bisher weniger gut untersucht worden. Von den Makroalgen wurden zwei Arten des Eulitorals näher untersucht: *Ulva lactuca* (WEST & PITMAN, 1967) und *Porphyra umbilicalis* (WIENCKE & LÄUCHLI, 1980; 1983; WIENCKE et al., 1984).

1.2. *Prasiola crispa*

Die thallose Grünalge *Prasiola crispa* (Lightfoot) Menegh. ist ein Kosmopolit. Ihre Verbreitung reicht von Grönland im Norden bis zur Antarktis im Süden (PANKOW et al., 1987). Sie wächst vorzugsweise in Küstennähe, wurde aber auch in den mitteleuropäischen Gebirgen bis 3000 m Höhe gefunden (KNEBEL, 1936). In der Antarktis lebt die Unterart *Prasiola crispa* ssp. *antarctica* (Kützing) Knebel, die dort eine der häufigsten Algen ist (Abb. 1 + 2) (SCHOFIELD & AHMADJIAN, 1972). Sie gilt als ausgesprochen nitrophil und Guano-liebend. In der Literatur finden sich gelegentlich widersprüchliche Angaben zum Vorkommen von *P. crispa* in der Antarktis. Während BROADY (1989b) und DAVEY (1989) *P. crispa* überwiegend auf nährstoffreichen Böden, wie beispielsweise Pinguin-Bänken, angetroffen haben, fanden GREENE et al. (1967) sie auch bestandbildend in Schmelzwassertümpeln. Nach WAGNER & ZANEVELD (1988) lebt *P. crispa* ausschließlich atmophytisch. Darüber hinaus kommt *P. crispa* als Phycobiont der antarktischen Flechte *Mastodia tessellata* vor (KAPPEN et al., 1987), möglicherweise existieren auch Mischformen zwischen der Flechte und freilebenden *Prasiola*-Thalli (HUISKES et al., pers. Mitteilung).

Da die Taxonomie der Gattung *Prasiola* teilweise unsicher ist, sind auch Verwechslungen mit der Süßwasserart *P. calophylla* häufiger vorgekommen (BROADY, 1989a). PANKOW et al. (1987) vermuteten, daß die von KNEBEL (1936) beschriebenen Unterarten *P. crispa* ssp. *antarctica* und ssp. *eucripsa* nur geographische Rassen von *P. crispa* darstellen. Die Familie der *Prasiolaceae*, deren einzige Gattung *Prasiola* ist, gehört zur Ordnung der Ulvales (Chlorophyta) (BOLD & WYNNE, 1985).

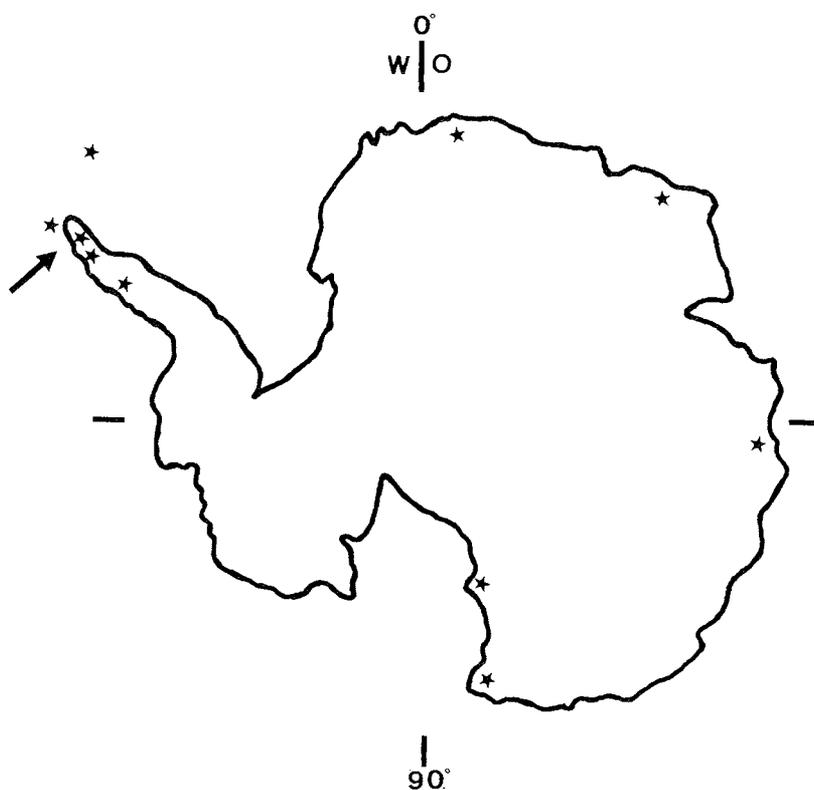


Abb. 1: Fundorte von *Prasiola crispa* (★) in der Antarktis.
 Der Pfeil bezeichnet die Stelle, an der die Kulturen
 für die vorliegende Arbeit isoliert wurden.
 (Verändert nach: GREENE et al., 1967; SCHOFIELD & AHMADJIAN, 1972; WIENCKE & tom DIECK, 1990)

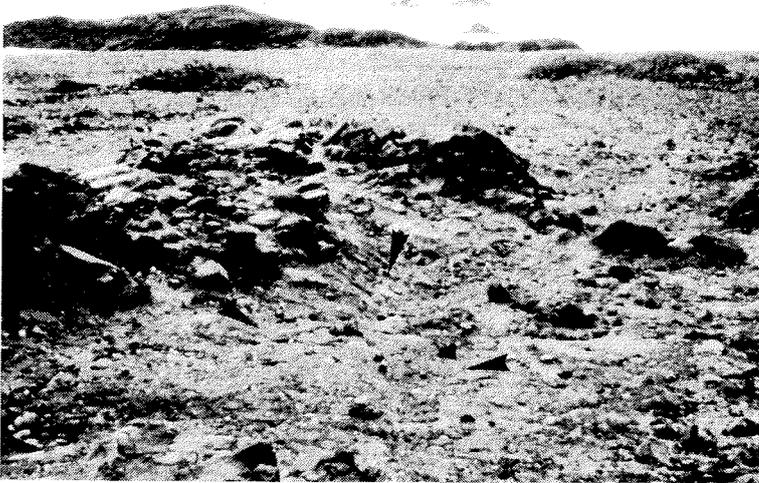


Abb. 2: *Prasiola crisper* ssp. *antarctica* (↖) am natürlichen Standort im Supralittoral der König-Georg-Insel (vor der antarktischen Halbinsel) Aufnahme von PD Dr. C. Wiencke

Über die Ultrastruktur von *P. crisper* wurde bisher nichts veröffentlicht, es gibt aber eine sehr ausführliche lichtmikroskopische Studie von KNEBEL (1936). Obwohl die lichtmikroskopische Analyse von *P. crisper* durch die dicken äußeren Zellwände und die geringe Zellgröße sehr erschwert wird, stimmen die Ergebnisse von KNEBEL gut mit den hier durchgeführten Untersuchungen überein.

KNEBEL beschreibt 3 verschiedene Stadien:

- Status Hormidii, einfache Zellfäden;
- Status Schizogonii, Bänder mit 2-5 Zellreihen;
- Status Prasiolae, flächige, einschichtige Thalli.

Die Zellen sind im Thallus in rechteckigen Feldern angeordnet. Im Zellinneren erkannte KNEBEL die großen, sternförmigen Chloroplasten mit dem stärkeumhüllten Pyrenoid und die lateral liegenden Zellkerne.

Neben der vegetativen Teilung der Thalli von *P. crisper* kommt auch die Vermehrung durch Akineten und Aplanosporen vor (KNEBEL, 1936).

1.3. Zur vorliegenden Arbeit

Nach einem alten Lehrsatz besteht in biologischen Systemen

"keine Struktur ohne Funktion
und
keine Funktion ohne Struktur".

Es ist daher von besonderem Interesse, die Ultrastruktur einer Alge unter osmotischem Streß oder nach Austrocknung in bezug zu ihren physiologischen Funktionen zu setzen. Bei einer Alge des Supralitorals, die solch variablen Bedingungen in ihrem Lebensraum ausgesetzt ist wie *P. crista*, darf man eine besondere Anpassungsfähigkeit an die oben genannten Streßfaktoren erwarten. Bisher wurden vergleichende ultrastrukturelle und physiologische Untersuchungen an einer solchen Alge noch nicht durchgeführt. Die antarktische Unterart *P. crista* ssp. *antarctica* ist darüber hinaus einem vielfältigen Kältestreß ausgesetzt. Dieser kann einerseits als Reduktion des Wasserpotentials wirken, andererseits ist die Austrocknungsfähigkeit eines Thallus ein wirkungsvoller Gefrierschutz.

In dieser Arbeit wurden ultrastrukturelle Veränderungen unter osmotischem Streß und nach Austrocknung dokumentiert. Sie wurden in bezug zu den gleichzeitig untersuchten physiologischen Änderungen gesetzt. Dabei wurden folgende physiologische Parameter bearbeitet:

- * Die Wachsraten in Medien verschiedener Salinitäten (0,35‰ bis 175‰) und in einer anschließenden Nachkultur (35‰).
- * Die Wachsraten in 35‰ nach vorausgegangener Trocknung der Algen (Trocknungsdauer: 1 Stunde bis 14 Tage).
- * Photosynthese und Atmung unter Salz- und Trockenstreß und nach der Rückführung in Kontrollbedingungen (35‰).
- * Der Wassergehalt und der Chlorophyllgehalt der Thalli.
- * Die intrazellulären Konzentrationen von Ionen und organischen Substanzen unter Salzstreß, sowie die Ionenkonzentrationen in der Zellwand.
- * Die elastische Verformung des Algenthallus nach osmotischem Schock.

Diese Untersuchungen stellen außerdem die Voraussetzung für weitere Forschungen zur Gefrierresistenz von *Prasiola crista* ssp. *antarctica* dar. Einige Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht oder befinden sich derzeit im Druck.

2. Material und Methoden

Vorbemerkung:

Um den methodischen Teil dieser Arbeit möglichst übersichtlich zu gestalten, wurden alle Rezepte für den Methodenteil in Anhang 1 (Seite 122 - 127) zusammengefasst. Aus dem gleichen Grunde wurden die Firmennachweise der verwendeten Verbrauchsmaterialien in Anhang 2 (Seite 128 - 129) gesammelt.

2.1. Algenmaterial

Thalli von *Prasiola crispa ssp. antarctica* (Kützing) Knebel wurden 1986 im Supralitoral auf der König-Georg-Insel, Antarktis, isoliert (CLAYTON & WIENCKE, 1986) (vgl. 1.2.). Seitdem werden unialgale Stammkulturen im Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven gehalten. Die Algen wachsen bei 0 °C in belüftetem PES-Medium und werden durchgehend mit ca. 25 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ beleuchtet. Sämtliches Versuchsmaterial stammte von diesen Stammkulturen. In der Kultur wurde nur das Stadium Prasiolae (vgl. 1.2.) beobachtet.

2.2. Allgemeine Methoden

2.2.1. Kulturbedingungen

In Hannover wurden die Algen in einem Kühlschrank bei 4 °C in 1-Liter Erlenmeyerkolben kultiviert. Das Kulturmedium wurde ständig mit gefilterter Luft (0,2 μm Selectron-Filter) durchblasen, so daß leichte Turbulenzen im Kulturmedium die Thalli ständig bewegten. Durch zwei seitliche Fenster wurden die Kolben mit ca. 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ beleuchtet (Osram Neonröhren L36W11), die Lichtphase dauerte 16 Stunden, die Dunkelphase 8 Stunden (WIENCKE & FISCHER, 1990).

2.2.2. Kultur- und Versuchsmedien

Für alle Stammkulturen und alle Versuche zur Austrocknungsresistenz wurde PES-Medium (nach Provasoli: McLACHLAN, 1973) benutzt. Dieses Medium wurde im Alfred-Wegener-Institut hergestellt, in 10-Liter-Kanistern nach Hannover gebracht und dort bis zu seiner Verwendung bei 4 °C gelagert. Es hatte eine Salinität von 35‰. Alle Versuche zur Salztoleranz wurden in dem künstlichen Seewassermedium ASP₁₂ (nach Provasoli: McLACHLAN, 1973; verändert) durchgeführt. Dieses Medium enthielt:

*NaCl	479,0 mM
*MgSO ₄	28,4 mM
*MgCl ₂	19,7 mM
*KCl	9,4 mM
*CaCl ₂	3,6 mM
NaNO ₃	1,2 mM
H ₃ BO ₃	185,0 µM
K ₃ PO ₄	47,0 µM
Na ₂ Glycerophosphat	31,7 µM
Spurenelementlösungen	PII und SII
Vitaminlösung	(vgl. Anhang 1)
Hepespuffer mit NaOH eingestellt auf	3,0 mM, pH 7,8

Das Kulturmedium wurde vor der Verwendung für einige Tage bei 4 °C belüftet, der pH-Wert mußte in dieser Zeit häufiger nachjustiert werden. Danach blieb er in allen Versuchen mit pH 7,8 ± 0,1 stabil.

Für die Einstellung verschiedener Salzkonzentrationen wurden die mit * gekennzeichneten Bestandteile von 0,01-fach (0,35‰) bis 5-fach (175‰) variiert (WRIGHT et al., 1989). Dadurch wurden über 99% der osmotisch wirksamen Substanzen verändert (bezogen auf die o.a. Normalkonzentration von 35‰). Das Angebot an Elementen mit Düngerwirkung (NO₃ oder PO₄), Vitaminen und Spurenelementen blieb aber konstant, um Mangelerscheinungen zu verhindern. Niedrigere Konzentrationen als 0,35‰ waren wegen der konstant gehaltenen Bestandteile nicht möglich; das 0,35‰ Medium hatte die gleiche Osmolarität wie Süßwasser. Bei Konzentrationen über 175‰ fiel bei 4 °C ein bräunlicher Niederschlag aus.

Wird die Salinität eines Kulturmediums im folgenden in ‰ angegeben, so handelt es sich um ein ASP₁₂-Kulturmedium der entsprechenden Salinität; dabei entspricht die normale Meerwasserkonzentration 35‰ (Normalmedium), Konzentrationen unter 35‰ werden als hypoosmotisch oder hyposalin bezeichnet, Konzentrationen über 35‰ als hyperosmotisch oder hypersalin.

2.2.3. Bestimmung der Frischgewichte (Fg und SFg)

Für die Analysen der Inhaltsstoffe, sowie für die Versuche zur Austrocknungstoleranz wurden die Thalli gründlich zwischen weichen Papiertüchern trockengetupft und sofort gewogen. Das so ermittelte Gewicht wurde Frischgewicht (Fg) genannt.

Vorversuche zeigten, daß das Trockentupfen offenbar mechanische Schäden am Thallus verursachen kann. Dies führte gelegentlich zu geringeren Wachstumsraten unter Salzstreß. Daher wurden die Thalli für die Bestimmung der Wachstumsraten in den Salinitätsversuchen nicht trockengetupft, sondern in einem kleinen Gewebesäckchen in einer Haushalts-Salatschleuder standardisiert trockengeschleudert. Das ermittelte Gewicht wurde als "Schleuder-Frischgewicht" (SFg) bezeichnet, es lag um 25% höher als das entsprechende Fg. Diese Wägungen wurden 5 mal wiederholt und waren gut reproduzierbar; die Standardabweichung 5 paralleler Wägungen lag unter 5% des SFg. Da aber bei dieser Methode immer ein kleiner Anteil Kulturmedium am Thallus haften blieb, konnte sie für die Versuche zur Austrocknungstoleranz nicht benutzt werden.

2.2.4. Bestimmung der Trockengewichte (Tg, Tr und org. Tr)

Für die Versuche zur Austrocknungstoleranz wurden trockengetupfte Thalli für unterschiedliche Zeiten bei 4 °C und ca. 50% relativer Luftfeuchtigkeit getrocknet. Das danach ermittelte Gewicht wurde als Trocknungsgewicht (Tg) bezeichnet. Um den Einfluß der Trocknungsdauer vom Einfluß des Wasserverlustes unterscheiden zu können, wurde in einer großen Deckelschale die rel. Luftfeuchtigkeit mit Silicagel oder feuchten Papiertüchern stark erniedrigt bzw. erhöht. Die Thalli lagen dabei in Petrischälchen und hatten keinen Kontakt zu den Beigaben.

Zur Bestimmung des absoluten Gewebe-Trockengewichtes (Tr) wurden die Thalli bei 80 °C für mindestens 10 Stunden bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Differenz aus Frischgewicht (Fg) und Gewebe-Trockengewicht (Tr) gibt den Wassergehalt der Thalli an (Zellwasser). Vermindert man das Gewebe-Trockengewicht (Tr) um das Gewicht der separat bestimmten Ionen (vgl. 2.2.8.), so ergibt sich das organische Trockengewicht (org. Tr).

2.2.5. Bestimmung der Wachstumsraten (RGR und WR)

Salinitätsversuche:

Thalli von ca. 150 mg SFg wurden in 1 Liter ASP₁₂-Kulturmedium für 2 Wochen in der zu testenden Salinität kultiviert. Das Medium wurde nach 1 Woche erneuert. Die relative Wachstumsrate (RGR) wurde nach 14 Tagen mit folgender Gleichung (LÜNING, 1985) bestimmt:

$$\text{RGR} = (\ln \text{SFg}_{\text{Ende}} - \ln \text{SFg}_{\text{Anfang}}) / 14 \text{ Tage} * 100\%$$

Einige Kulturen wurden nach der 2-wöchigen Salzbehandlung wieder in normales Meerwasser (35‰) überführt. Nach abermals 2 Wochen wurde die relative Wachstumsrate für die 14 Tage dieser Nachkultur mit der o.a. Formel berechnet.

Austrocknungsversuche:

Thalli von ca. 150 mg Fg wurden nach der Trocknung (vgl. 2.2.4.) für eine Woche in PES-Medium kultiviert. Danach wurde die relative Wachstumsrate wie folgt bestimmt:

$$\text{RGR} = (\ln \text{Fg}_{\text{Ende}} - \ln \text{Fg}_{\text{Anfang}}) / 7 \text{ Tage} * 100\%$$

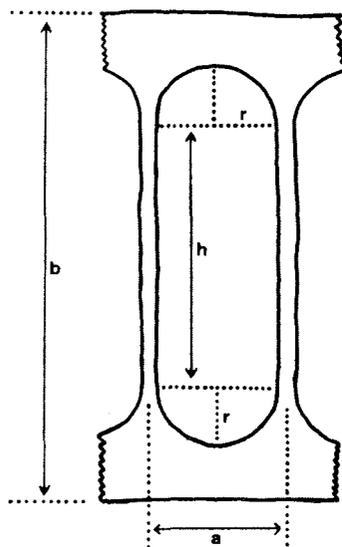
Als Fg_{Anfang} wurde das Fg vor Trocknungsbeginn bestimmt.

Wuchsrate (WR):

Die Kulturversuche verteilten sich aus technischen Gründen über einen längeren Zeitraum. Die relativen Wachstumsraten (RGR) der Stammkulturen schwankten in dieser Zeit zwischen 5% und 11%. Dies ist möglicherweise auf jahreszeitliche Veränderungen (endogen und exogen) zurückzuführen. Daher konnten die relativen Wachstumsraten der verschiedenen Versuchsteile nicht unmittelbar miteinander verglichen werden. Es wurden daher häufig Kontrollversuche in 35‰-Medium bzw. in PES-Medium durchgeführt. Im Ergebnisteil sind die o.a. relativen Wachstumsraten auf diese zeitgleich ermittelten Kontrollraten bezogen, sie werden dann als Wuchsrate (WR) bezeichnet. Eine Wuchsrate (WR) von 100% entspricht also einer relativen Wachstumsrate (RGR) von 5 - 11%, je nach Zustand der Stammkultur.

2.2.6. Berechnung von Zell- und Protoplastenvolumen

Um die Volumina von Protoplast und Zellwand abschätzen zu können, wurde eine große Zahl von Ultradünnschnitten und Gefrierbrüchen ausgewertet. Die daraus ermittelten Durchschnittswerte für die Zellmaße (35‰-Kultur) sind in folgender Darstellung wiedergegeben:



$$\begin{aligned} a &= 4,2 \mu\text{m} \\ b &= 16,5 \mu\text{m} \\ r &= 1,9 \mu\text{m} \\ h &= 9,0 \mu\text{m} \end{aligned}$$

Zellvolumen:

$$a^2 * b = 291 \mu\text{m}^3$$

Protoplast:

$$\begin{aligned} &(\pi r^2 * h) + (4/3 \pi r^3) \\ &= 139 \mu\text{m}^3 \\ &(\equiv 48\% \text{ der Zelle}) \end{aligned}$$

Abb. 3: Maße von Zelle und Protoplast

Nach den Berechnungen mit den angegebenen mathematischen Formeln ergab sich ein Protoplasten-Volumen von ungefähr der Hälfte des Gesamtvolumens. Zur Kalkulation des osmotischen Potentials (vgl. 3.1.2.3.) wurden daher die gefundenen Konzentrationen der anorganischen und organischen Osmotika (bezogen auf das Fg) verdoppelt, um so die wahrscheinlichen Konzentrationen des Protoplasten zu erhalten. Sonstige nicht-osmotische Volumina, wie z.B. Stärkekörner oder lipophile Globuli, wurden nicht berücksichtigt, da sie nicht quantifiziert werden konnten.

Die Dichte der Thalli lag nahe bei 1 g/cm³, daher wurde 1 g Fg des Protoplasten mit 1 ml Protoplasten-Volumen gleichgesetzt. Zur Vereinfachung wurde bei allen Osmotika 1 mol = 1 osmol gesetzt; dies reichte aus, um einen guten Näherungswert zu erhalten.

2.2.7. Vitalfärbungen

Um die Vitalität der Thalli zu testen, sollten Färbungen mit Acridin Orange, Evans Blue oder Auramine O durchgeführt werden. Die Färbetechnik mit Auramine O wurde von HAWES & DAVEY (1989) beschrieben und von DAVEY (1989) in Feldversuchen an *P. crispus* eingesetzt.

In den hier durchgeführten Versuchen wurde aber bei allen o.a. Methoden immer eine starke, unspezifische Färbung der Thalli beobachtet. Diese ist vermutlich auf die anhaftenden Bakterien (vgl. Abb. 11) und extrazelluläre Stoffe zurückzuführen. Da eine Vitalitätsbestimmung unter diesen Umständen nicht möglich war, wurden die Wachstumsrate (WR) oder auch die Photosynthese- und Atmungsraten als Vitalitätskriterien herangezogen.

Die Abschirmung der Zellwände nach außen durch aufgelagerte Substanzen wurde mit einer Neutralrot-Färbung nachgewiesen.

2.2.8. Extraktion

Die Thalli wurden vorsichtig mit Papiertüchern trockengetupft und zweimal je 2 Minuten in eisgekühlter isotonischer $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - oder MgCl_2 -Lösung gewaschen. Nach dem erneuten sorgfältigen Trocknen wurden ca. 10 mg Fg je ml Extraktionsflüssigkeit eingewogen. Als Extraktionsgefäße dienten verschraubbare Glasröhrchen oder Kunststoff-Reaktionsgefäße. Für die Ionenanalysen wurden die Proben vor der Extraktion mindestens 10 Stunden bei 80°C getrocknet und dann entweder in 1,4 N HNO_3 bzw. 7 N HNO_3 feucht verascht (über Nacht bei 80°C) oder in 0,1 N HCl oder aqua bidest. extrahiert (4 Stunden bei 100°C). Die Proben für die organischen Inhaltsstoffe wurden frisch in aqua bidest. (4 Stunden bei 95°C) oder Ethanol (1 Stunde in 100% bei 75°C , dann verdünnt mit aqua bidest. auf 25% und 3 Stunden bei 95°C) extrahiert. Außerdem wurden auch die Ionengehalte nicht gewaschener Proben gemessen.

Um extraktionsbedingte Fehler auszuschließen, wurden bei fast allen folgenden Analysen mehrere verschiedene Extraktionsmethoden miteinander verglichen:

	H ₂ O	Ethanol	0,1 N HCl	1,4 N HNO ₃	7 N HNO ₃
Na	--	--	X	X	X
K	X	--	X	X	X
Ca	X	--	X	--	X
Mg	X	--	--	X	X
NH ₄	X	--	--	--	--
Cl	X	--	--	X	--
NO ₃	X	--	--	--	X
SO ₄	--	--	X	--	--
PO ₄	X	--	X	X	X
Aminos.	X	X	--	--	--
Glukose	X	X	--	--	--
Sacch.	X	X	--	--	--
Sorbit	X	X	--	--	--

2.2.9. Ionenanalysen

Die Konzentrationen von Na⁺ und K⁺ wurden nach entsprechender Verdünnung mit einem Flammenphotometer (Eppendorff) in einer Propan-Flamme gemessen. Die Bestimmung der Ca²⁺ und Mg²⁺-Gehalte erfolgte mit einem Atomabsorptionsspektrometer (PU9100X, Philips) in einer Acetylen-Flamme. NH₄⁺ wurde mit Nefler's Reagenz bestimmt (LANGE & VEJDELEK, 1980). Die Cl-Konzentrationen wurden mit dem Chloridtitrator (3864P, Aminco) ermittelt. NO₃⁻ wurde mit Chromotropsäure, Brucinsulfat (LANGE & VEJDELEK, 1980) und mit einem Schnelltest (Macherey - Nagel) analysiert. Die PO₄³⁻-Gehalte wurden mit der Vanadat-Methode (LANGE & VEJDELEK, 1980) bestimmt, die SO₄²⁻-Werte durch eine Trübungsmessung (JACKSON & McCANDLESS, 1978) oder mit einem Schnelltest (Merck).

Der Versuch, die Anionen-Konzentrationen mit dem Ion-Chromatograph (Metrohm) zu bestimmen; war (vermutlich wegen der hohen Phosphatkonzentrationen) mit der vorhandenen Säulenausrüstung nicht erfolgreich.

2.2.10. Analyse der organischen Inhaltsstoffe

Chlorophyll wurde mit N,N-Dimethylformamid extrahiert und photometrisch gemessen (INSKEEP & BLOOM, 1985), freie Aminosäuren wurden mit Ninhydrin nachgewiesen (SPIES, 1957). Die Konzentrationen von Glukose, Saccharose und Sorbit wurden mit Enzymtests (Boehringer) bestimmt.

2.2.11. Berechnung des extrazellulären Raumes (ECS)

Der Extrazelluläre Raum (ECS) einer Alge besteht aus der Lösung in der Zellwand (AFS) und dem Haftwasser. Hierbei sind auch evtl. vorhandene Schleimauflagerungen und die Oberflächenform des Thallus von Bedeutung. Der ECS bei *P. crista* sollte durch Inkubation mit Dextranblau (ZMIRI & GINZBURG, 1983) gemessen werden, denn das elektrisch neutrale Dextranblau-Molekül ist so groß ($MW = 2 \cdot 10^6$), daß es das Plasmalemma nicht passieren kann und keine Bindungen mit den Strukturen der Zellwand eingeht.

Die Thalli wurden in einer 0,1%igen Farblösung inkubiert, abgetrocknet und dann in ungefärbter Lösung ausgewaschen. Aus der Menge des übertragenen Farbstoffs sollte auf das Volumen des ECS rückgeschlossen werden. Im Versuch stellte sich aber heraus, daß das Dextranblau in der Zellwand angereichert wurde. Daher war nur eine ungefähre Abschätzung über das ECS-Volumen möglich. Sie ergab einen Wert von ca. 50% des Thallusvolumens. Dieser Wert stimmt gut mit den ermittelten Volumina von Protoplast und Zellwand (vgl. 2.2.6.) überein und wird auch durch Ionenanalysen ungewaschener Thalli bestätigt (vgl. 3.1.2.3.).

Parallelversuche mit Acridin Orange, Fast Green, Evans Blue, $K_4Fe(CN)_6$ und verdünnter Tinte zeigten die gleichen methodischen Probleme, bestätigten aber im wesentlichen das o.a. Ergebnis.

2.2.12. Dichtebestimmungen bei Medien und Thalli

Die Dichte der verschiedenen Medien (0,35‰ - 175‰) wurde durch häufiges Pipettieren von 1 ml auf eine Analysenwaage im Vergleich mit aqua bidest. ermittelt. Zur Bestimmung der Dichte eines Thallusstückchens wurde dieses mit einer Pinzette in die Mitte eines Gläschens mit einer Testlösung gegeben. Die Dichte dieser Testlösung wurde durch Zugabe von konzentrierter Salzlösung bzw. von Wasser so eingestellt, daß das Thallusstückchen eine kurze Zeit darin schwebte, bevor es (bedingt durch den osmotischen Wasserverlust) zu Boden sank. Die Dichte der so eingestellten Testlösung entsprach der Dichte des Thallus und wurde mit der o.a. Methode bestimmt.

Aus der Dichte eines Thallusstückchens vor und nach einem osmotischen Schock konnte auf die Änderung des Thallusvolumens rückgeschlossen werden.

2.2.13. Bestimmung der Osmolalität der Kulturmedien

Die Osmolalität der benutzten Kulturlösungen zwischen 0,35‰ und 70‰ wurde durch Gefrierpunktniedrigung mit einem Beckmann-Thermometer und mit einem Osmomat 030 (Gonotec) bestimmt; die Meßwerte stimmten gut überein. Die Osmolalität des 175‰-Mediums lag außerhalb der Meßbereiche, sie wurde aus den anderen Werten extrapoliert.

2.2.14. Messung der Thallusdehnung nach osmotischem Schock

Kleine Thallusstücke wurden auf einem Objektträger im Lichtmikroskop (Photomikroskop III, Zeiss) bei kleinster Vergrößerung fotografiert. Dann wurde das 35‰-Medium auf dem Objektträger durch ein Testmedium anderer Salinität (0,35‰ bis 175‰) ersetzt. Zwischen 10 Minuten und 5 Stunden nach diesem Down- bzw. Upshock wurde der Thallus mehrfach fotografiert, wobei er zwischendurch bei 4 °C in einem großen Tropfen des Testmediums gehalten wurde. Die Längenänderung des Thallus konnte später auf den projizierten Negativen anhand markanter Stellen des Thallus vermessen werden.

Es wurden 4 verschiedene Varianten untersucht:

1. Thalli aus Normalkultur, nach dem Schock im Licht gehalten
2. Thalli aus Normalkultur, nach dem Schock im Dunkel gehalten
3. Thalli aus Hungerkultur, nach dem Schock im Licht gehalten
4. Thalli aus Hungerkultur, nach dem Schock im Dunkel gehalten

Die Hungerkulturen waren zuvor für 6 Wochen ohne Licht kultiviert worden, so daß die Zellen nur noch wenig Stärke enthielten.

Um den Anteil der Zellwand an der Volumenänderung festzustellen, wurden Kontrollversuche mit abgetöteten Thalli durchgeführt. Die Membranen waren dabei mit 5%iger Detergenzlösung (Triton X100) für eine Stunde oder durch eine 4-stündige Behandlung mit 4% Glutaraldehyd perforiert worden. Zum Vergleich wurden andere Thalli durch Ultraschall-Behandlung oder langsames Einfrieren abgetötet. Beim Einfrieren wurden die Thalli in 10 ml PES-Medium in einem Gefrierschrank auf -28 °C gefroren und dann 3 Minuten in flüssigen Stickstoff (-196 °C) getaucht. Anschließend tauten sie bei Raumtemperatur auf. Diese Behandlung wurde noch einmal wiederholt.

Nach dem Abtöten lagerten die Thalli einige Stunden in 35‰-Medium. Ein Thallusstück enthielt zwischen 20.000 und 30.000 Zellen.

2.2.15. Messung der Photosynthese- und Atmungsraten

Die O₂-Entwicklung bei der Photosynthese bzw. der O₂-Verbrauch bei der Dunkelatmung wurden mit einer Clark-Elektrode (Hansatech, Bachhofer) bei 4 °C gemessen. Die Küvette hatte ein Probenvolumen von 2 ml und wurde mit Kulturmedium (ASP₁₂-Medium der entsprechenden Salinität oder PES) gefüllt. Die Thallusstücke von ca. 5 mg Fg wurden an einem Nylonfaden in der Küvette aufgehängt. Der Thallus konnte mit Lichtintensitäten zwischen 3 und 300 μE/m²s beleuchtet oder im Dunkel gehalten werden. Für jede getestete Salinitätsstufe wurde ein Lichtprofil erstellt, bei den übrigen Versuchen wurden nur Photosynthese bei 300 μE/m²s (im Bereich der Lichtsättigung) und Dunkelatmung gemessen. Die Meßwerte wurden mit einem Schreiber (Servogor 210, BBC Goerz) protokolliert und später ausgewertet. Die O₂-Gehalte der verschiedenen Versuchsmedien wurden zunächst nach TRUESDALE et al. (1955) berechnet. Da nach den dort angegebenen Formeln bei 175‰ negative (!) O₂-Konzentrationen vorliegen müßten, wurde der O₂-Gehalt mit einem Schnelltest nach Winkler (Macherey - Nagel) überprüft. Danach wurden folgende Werte gefunden:

0,35‰	12,7 mg O ₂ / l	alle Werte bei 4 °C
17‰	11,4 mg O ₂ / l	
35‰	10,1 mg O ₂ / l	
70‰	8,5 mg O ₂ / l	
175‰	4,6 mg O ₂ / l	

Zwischen 0,35‰ und 35‰ stimmten berechnete und gemessene Werte überein. Vorversuche mit größeren Thallusstücken (20 - 60 mg Fg) in einer Eschweiler O₂-Elektrode und unter Zusatz von 4 mM NaHCO₃ zum Versuchsmedium zeigten keine abweichenden Ergebnisse. Getestet wurden:

1. Thalli nach 14 Tagen in verschiedenen Salinitäten
(0,35‰; 17‰; 35‰; 70‰; 175‰)
2. Thalli nach osmotischem Upshock von 35‰ auf 175‰
zu verschiedenen Zeiten (0 - 8 Stunden)
3. Thalli in der Nachkultur nach 175‰-Behandlung
(vgl. 2.2.5.) zu verschiedenen Zeiten (0 - 3 Tage)
4. Thalli nach unterschiedlich langen Trocknungszeiten: sofort,
3 Stunden, 8 Stunden oder 3 Tage nach der Wiederbenetzung

Da keine Möglichkeit bestand, die Photosynthese- und Atmungsraten während der Austrocknung quantitativ zu bestimmen (URAS), wurde für diese Fragestellung ein einfacher qualitativer Test gewählt:

In 10ml-Reagenzgläser wurden 2 ml einer Kresolrot-Indikatorlösung (vgl. Anhang 1) gegeben, deren Farbton in Abhängigkeit vom CO₂-Gehalt des darüber befindlichen Gases zwischen gelb und violett schwankte. Kleine Thallusstücke wurden an einem Faden über die Indikatorlösung gehängt, das Reagenzglas wurde gasdicht verschlossen und bei 4 °C im Licht (70 μE/m²s) oder im Dunkel inkubiert. Photosynthese (CO₂ Verbrauch im Licht) oder Atmung (CO₂-Produktion im Dunkel) konnte anhand der Farbänderung des Indikators qualitativ nachgewiesen werden. Über die Höhe des CO₂-Umsatzes konnten jedoch keine verlässlichen Angaben gemacht werden.

2.3. Methoden für die Elektronenmikroskopie

2.3.1. Präparation

Die Thalli wurden abgetupft und mit einer Rasierklinge in kleine Stücke von ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten.

2.3.2. Fixierung mit Aldehyd

Die meisten Proben wurden mit 1% oder 2% Glutaraldehyd fixiert, die maximale Konzentration betrug 8%. Die Fixierung begann im Eisbad bei 4 °C für 1 Stunde, dann wurden die meisten Proben langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die Gesamtdauer der Aldehydfixierung betrug im allgemeinen 2 Stunden, doch wurden einzelne Proben bis zu 48 Stunden fixiert. Bei einigen Proben wurde auch ein Gemisch von Glutaraldehyd und Formaldehyd (1:1) angewendet.

Als Fixierungspuffer diente das Kulturmedium, das 3 mM Hepes-Puffer enthielt und mit NaOH auf pH 7,8 eingestellt war (vgl. 2.2.2.). Um das Fixierungsgemisch im isotonischen Bereich zu halten, wurde es gegebenenfalls bei der Aldehydzugabe mit einer entsprechenden Menge aqua bidest. verdünnt. Da Hepes-Puffer nicht mit Aldehyden oder OsO₄ reagiert, ist er für die Elektronenmikroskopie besonders geeignet (McFADDEN & MELKONIAN, 1986).

2.3.3. Fixierung mit Osmiumtetroxid (OsO₄)

Nach der Aldehydfixierung folgte eine Behandlung mit 0,5% - 2% OsO₄ im Kulturmedium. Diese zweite Fixierung dauerte zwischen 0,5 und 2 Stunden; sie wurde im allgemeinen bei Raumtemperatur, selten auch bei 4 °C durchgeführt.

2.3.4. Blockkontrastierung mit Uranylacetat

Einige Proben wurden nicht mit OsO₄ behandelt (vgl. 2.3.7.c), sondern mit 1%iger wässriger Uranylacetatlösung bei 40 °C für 5 Stunden im Dunkeln blockkontrastiert (PLATTNER & ZINGSHEIM, 1987).

2.3.5. Enzymbehandlung mit Pektinase und Pektinesterase

Vor der Enzymbehandlung wurden die Proben mit Glutaraldehyd und Osmium fixiert. Zum Abbau der Zellwand wurden sie dann mit 1% Pektinase in 10 mM MES-Puffer pH 5,5 für 2-3 Tage bei 22 °C inkubiert. Da die Erhaltung der Ultrastruktur nach dieser Behandlung sowie bei den Kontrollen (nur in MES-Puffer, ohne Pektinase) sehr schlecht war, wurde der Versuch mit Pektinesterase wiederholt. Hierfür wurden die Proben in 10 mM Hepes-Puffer pH 7,5 mit 40 Enzymeinheiten/ml Pektinesterase für 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert. Nach der Enzymbehandlung wurden die Proben normal entwässert und weiterbehandelt.

2.3.6. Entwässerung

Kleine Glasgefäße mit den fixierten Proben in ca. 1 ml aqua bidest. wurden in einen Exsikkator mit Aceton und CaCl₂ gestellt. Darin wurden sie über Nacht stufenlos entwässert (SITTE, 1962); am nächsten Morgen befanden sie sich in ca. 80% Aceton. Zur weiteren Entwässerung wurde die Probenflüssigkeit alle 15 Minuten ausgetauscht, wobei die Aceton-Konzentration schrittweise erhöht wurde auf 90%, 95%, 100% und 100% Aceton, getrocknet auf Molekularsieben. In der letzten Konzentrationsstufe blieben die Proben zweimal für mindestens 20 Minuten, dann begann die Infiltration mit dem Einbettungsmittel.

Bei einigen Proben wurde, um eine vollständige Entwässerung sicherzustellen, eine zweistündige Behandlung mit Dimethoxypropan (DMP) angefügt. DMP reagiert mit Wasser unter Bildung von Aceton und bietet daher Gewähr für eine vollständige Entwässerung der Proben (KAESER, 1989).

Bei anderen Proben wurde an die Aceton-Entwässerung noch ein Austausch gegen Propylenoxid (2 Stunden) angeschlossen.

2.3.7. Einbettung

Für die Einbettung der Proben wurden drei verschiedene Einbettungsmittel benutzt:

- a) Araldit (Durcupan ACM, Fluka)
- b) Spurr's Medium (vgl. Anhang 1)

Diese Einbettungsmittel wurden in einer Anfangskonzentration von 20 - 50% zur letzten Entwässerungsstufe gegeben, die Gefäße wurden verschlossen und für 4 - 8 Stunden auf einem Rotor bewegt.

Dann wurden die Gefäße wieder geöffnet, so daß das Entwässerungsmittel verdampfen konnte und das Einbettungsmittel sich langsam auf 100% konzentrierte. Nach einem Austausch gegen frisches Einbettungsmittel wurden die Proben in kleinen Förmchen polymerisiert. Durcupan polymerisierte 48 Stunden bei 40°C und nachfolgend 48 Stunden bei 60°C, Spurr's Medium war nach 14 Stunden bei 70°C ausgehärtet. Nach 1-2 Wochen Lagerung konnten die Proben weiter bearbeitet werden.

- c) Nanoplast FB 101

Nanoplast ist ein relativ neues Einbettungsmittel, das vollständig mit Wasser mischbar ist (FRÖSCH et al., 1983; FRÖSCH & WESTPHAL, 1989). Da es 1% Formaldehyd enthält, können Proben ohne vorherige Fixierung direkt in einem Arbeitsschritt eingebettet werden. Die Polymerisation erfolgt für 24 Stunden bei Raumtemperatur in einem Exsikkator, dann jeweils 48 Stunden bei 40°C und bei 60°C. Die Strukturhaltung ist relativ gut, sofern die eingebetteten Zellen keine großen Vakuolen besitzen (LEHMANN et al., 1991). Da OsO₄ die Polymerisation von Nanoplast stört, dürfen die Proben nicht mit OsO₄ vorbehandelt werden. Um trotzdem eine gute Darstellung der Membranen zu erreichen, hat sich die Blockkontrastierung mit Uranylacetat (vgl. 2.3.4.) bewährt. Die ultradünn geschnittenen Präparate konnten problemlos mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert werden (vgl. 2.3.9.).

2.3.8. Ultradünnschnitte

Die eingebetteten Proben wurden mit einem Pyramitom (11800, LKB) getrimmt, so daß eine trapezförmige Schnittfläche von ca. 50 * 50 µm entstand. Dafür wurden Glasmesser benutzt, die mit einem KnifeMaker (7801 A, LKB) aus 2,5 cm breitem Tafelglas gebrochen wurden. Ultradünnschnitte von 60 - 80 nm Dicke wurden am Ultracut E (Reichert-Jung) unter Verwendung eines Diamantmessers (Dupont) geschnitten. Die Schnittgeschwindigkeit betrug ca. 1,5 mm/s, der Freiwinkel des

Messers war auf 4° eingestellt. Nach dem Strecken mit Xylol (nicht möglich bei Nanoplast-Präparaten) wurden die Schnitte auf Kupfergrids, die mit 0,55% Pioloform F befilmt worden waren, aufgefangen.

2.3.9. Nachkontrastierung

Die Grids mit den Ultradiünnschnitten wurden in eine spezielle Träger-Kunststoffplatte eingesteckt, die dann "über Kopf" in kleine Schalen mit den Kontrastierungslösungen gelegt werden konnte. Kontrastiert wurde zuerst mit 2% wässriger Uranylacetat-Lösung, die vor Gebrauch zentrifugiert wurde. Diese Kontrastierung dauerte 12 Minuten bei Raumtemperatur, danach wurden die Grids gründlich mit aqua bidest. gespült. Im zweiten Schritt wurde mit einer Bleicitratlösung (vgl. Anhang 1) für 5 Minuten bei Raumtemperatur kontrastiert. Nach dem Abspülen mit aqua bidest. wurden die Grids an der Luft getrocknet, das überschüssige Wasser war zuvor vorsichtig mit einem Filterpapier abgesaugt worden.

Die hier beschriebene Standard-Methode wurde für die Untersuchungen zum Kontrastverlust der Globuli abgewandelt (vgl. 2.3.13).

2.3.10. Gefrierbrüche

Ein Teil der Proben wurde mit 2% Glutaraldehyd im Kulturmedium (pH 7,8) für 2 Stunden vorfixiert und dann in 5 Stunden stufenweise mit Glycerin bis zur Endkonzentration von 30% infiltriert (Gefrierschutz gegen Eiskristallbildung, WIENCKE & LÄUCHLI, 1980). Die meisten Proben wurden aber unbehandelt eingefroren. Dazu wurden Thallusstückchen von ca. 1 mm Kantenlänge auf Goldobjekthalter (Balzers) gegeben und in unterkühlten Stickstoff oder in N₂-gekühltes Isopropanol eingetaucht. Zum schnellen Eintauchen diente ein Preßluftkolben, der die Proben mit einer Geschwindigkeit von ca. 4 m/s in das Kühlmittel stieß.

Die Proben wurden dann unter flüssigem N₂ auf den Probentisch montiert und in die Gefrierätzungsanlage (BA 360 M, Balzers) eingeschleust. Die Proben wurden bei -180°C aufgebrochen; anschließend wurde aus Elektronenstrahl-Verdampfern zuerst eine Platin/Kohle Schicht (95% Platin, 5% Kohle) im Winkel von 45°, dann eine reine Kohleschicht im Winkel von 90° auf die freigelegte Bruchfläche des Präparates gedampft. Die so erhaltenen Platin/Kohle-Abdrücke wurden auf Wasser von den Präparaten abgeschwemmt und anschließend mit Chromschwefelsäure (über Nacht) und Chlorbleichlauge (4 - 8 Stunden) gereinigt. Nach gründlichem Spülen mit aqua bidest. wurden sie auf befilmt 600 mesh-Kupfergrids aufgenommen.

2.3.11. Elektronenmikroskopie

Alle Präparate wurden im EM 10A (Zeiss) untersucht. Dabei betrug die Beschleunigungsspannung 80 kV (bei Gefrierbruchpräparaten 60 kV), die Kontrastblende hatte einen Durchmesser von 30 μm . Photos wurden auf Guilleminot Planfilm aufgenommen, die Belichtung erfolgte automatisch. Die Abzüge wurden auf Brovira-Speed Photopapier (Agfa) belichtet und in einem Automaten (Metiform 5040, Meteor) entwickelt.

2.3.12. EELS-Technik

Für die Messungen von Natrium, Chlor, Schwefel und Phosphor mit der Elektronen-Energieverlust-Spektroskopie (Electron-Energy-Loss-Spectroscopy = EELS-Technik) wurden von unfixiert in Nanoplast eingebetteten Proben Ultradünnschnitte mit ca. 50nm Dicke hergestellt. Die Schnitte wurden auf unbefilmte 600-mesh-Dünnsteg-Kupfernetze aufgenommen und nicht nachkontrastiert. Die EELS-Messungen wurden im CEM 902 (Zeiss) durchgeführt.

Anmerkung zur EELS-Technik:

Beim Durchstrahlen eines Präparates im Elektronenmikroskop erleiden manche Elektronen einen Energieverlust. Dieser Energieverlust ist Element-spezifisch für die durchstrahlten Atome und kann mit einem Spektrometer im CEM 902 analysiert werden. Aus der Analyse der Energieverlust-Spektren kann daher auf die chemische Zusammensetzung der durchstrahlten Probe rückgeschlossen werden. Da die Messungen bei 30.000-facher Vergrößerung durchgeführt werden, ist eine sehr gute räumliche Auflösung der Analyse möglich. Die Auswertung der Energieverlust-Spektren erfolgt mit einem Computer, der in das Analysesystem integriert ist.

Für weitere Erklärungen zur EELS-Technik sei auf die folgenden Literaturangaben verwiesen: OTTENSMEYER & ANDREW, 1980; BAUER et al., 1985; LEHMANN et al., 1990. Die untere Nachweisgrenze in biologischen Proben liegt z.Zt. bei ca. 0,1 molar (eigene Experimente). Obwohl gerätetechnisch auch weitaus geringere Konzentrationen nachweisbar sind, bereitet die Analyse biologischer (insbesondere botanischer) Proben noch erhebliche Schwierigkeiten. Ein Hauptproblem besteht in der Auswaschung der zu analysierenden Substanzen, so daß derzeit nur solche Stoffe gemessen werden können, die als schwer lösliche Verbindungen mit hohen lokalen Konzentrationen in den Proben enthalten sind.

Ein ähnliches Verfahren ist die ESI-Technik (Electron-Spectroscopic-Imaging). Hier wird die Verteilung eines chemischen Elementes im elektronenmikroskopischen Bild sichtbar gemacht. Die ESI-Technik kann auch zur Bildverbesserung kontrastarmer Präparate eingesetzt werden (vgl. Abb. 31 + 32).

2.3.13. Testserie zum Kontrastverlust (vgl. 3.3.)

Für die Untersuchung des Kontrastverlustes bei der Nach-kontrastierung wurde die Standard-Methode (vgl. 2.3.9.) in folgender Weise abgewandelt:

Die Uranylkontrastierung wurde 3, 12, oder 60 Minuten ausgeführt, einige Proben wurden nicht mit Uranylacetat behandelt. Die Zeitdauer der Bleikontrastierung wurde zwischen 10 Sekunden, 1, 5, 15 und 60 Minuten variiert. Außerdem wurden folgende Lösungen getestet:

- * verdünnte Essig- oder Citronensäure mit pH 4
zur Simulation des pH-Wertes der Uranylacetat-Lösung
- * verdünnte NaOH, BaOH-Lösung oder 20% NH_3 -Lösung pH 12
zur Simulation des pH-Wertes der Bleicitrat-Lösung
- * 50mM Citrat, mit NaOH auf pH 12 eingestellt
- * 0,1M EDTA-Lösung, mit NaOH auf pH 12 eingestellt
- * "bleifreie Bleilösung", in der das Bleisalz
(vgl. Anhang 1) durch NaNO_3 ersetzt worden war
- * 7,5% wässrige H_2O_2 -Lösung

In einer weiteren Versuchsserie wurden die Schnitte nach den o.a. Testlösungen nochmals 30 Minuten mit 1% OsO_4 in aqua bidest. behandelt.

2.4. Statistik

Werden für Meßergebnisse Zahlenwerte angegeben, so handelt es sich um das arithmetische Mittel (MW). Die Standardabweichungen (SD) sind in die Grafiken eingetragen; sie sind (ebenso wie der Umfang "n" der Stichprobe) in den Tabellen im Anhang 3 mit aufgeführt. Konnte ein Versuch nur mit weniger als 3 Parallelen durchgeführt werden, so sind keine Standardabweichungen angegeben.

Wurden zwei Stichproben auf Verschiedenheit untersucht, so geschah dies mit dem t-Test (Student-Verteilung). Bei Irrtums-Wahrscheinlichkeiten kleiner 5% wird von signifikanten Unterschieden gesprochen; ist die Irrtums-Wahrscheinlichkeit kleiner 1%, so heißen die Unterschiede hoch signifikant.

3. Ergebnisse

Vorbemerkung:

Im Ergebnisteil werden zahlenmäßig erfasste Parameter (Wachstum, Konzentrationen) häufig nur in Grafiken dargestellt. Die Daten, auf denen diese Grafiken beruhen, sind als Tabellen in Anhang 3 (Seite 130 - 140) zusammengestellt, dort finden sich auch Angaben zur Statistik. Die Standardabweichung ist in die meisten Grafiken eingetragen.

In allen elektronenmikroskopischen Abbildungen ist ein Maßbalken eingefügt. Sofern kein anderer Wert (in μm) angegeben ist, zeigt die Balkenlänge 1 μm an. In Anhang 4 (Seite 141 - 142) sind die Präparations-Angaben zu den elektronenmikroskopischen Abbildungen zusammengefaßt. Die Buchstaben der Bildbeschriftungen sind in das Abkürzungsverzeichnis auf Seite 143 aufgenommen.

3.1. Versuche mit unterschiedlichen Salinitäten

3.1.1. Thallus-Morphologie und Langzeitversuche

Bereits nach 14-tägiger Kulturdauer konnten in Abhängigkeit von der Salinität des Kulturmediums leichte Veränderungen in der Thallusmorphologie festgestellt werden. Während die Thalli im Normalmedium (ASP₁₂ oder PES) ungefähr haselnußgroß und leicht gekräuselt waren (Abb. 4b), wuchsen sie unter geringeren Salinitäten flacher, sie erschienen dann heller. Der in Abb. 4a gezeigte Thallus ist 3 Monate lang unter hypoosmotischen Bedingungen (7‰) gewachsen.

Auch nach 8-monatiger Kultur in hypoosmotischen Medien war keine Schädigung der Thalli sichtbar, die anschließende Rückführung in normales Medium wurde ebenfalls gut ertragen.

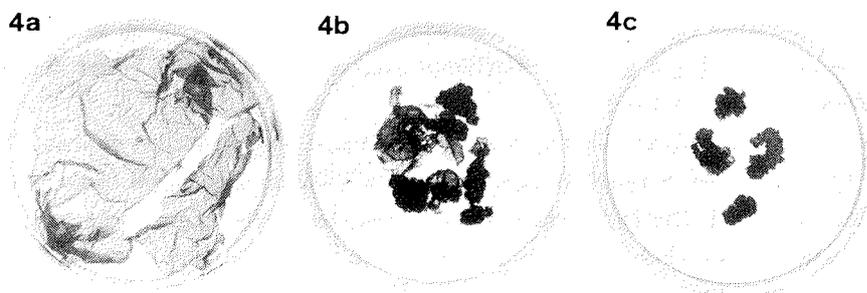


Abb. 4: Morphologie unter verschiedenen Salinitäten

a) 3 Monate bei 7‰

b) Normalkultur in 35‰

c) 1 Monat in 175‰

alle Abbildungen ca. 1/3 natürliche Größe

In hyperosmotischem Medium dagegen blieben die Thalli kleiner und stärker gekräuselt (Abb. 4c, 1 Monat in 175‰); sie sahen dann dunkler aus. In Abhängigkeit von der Salzkonzentration begannen die Algen in diesen Medien nach einiger Zeit abzusterben, dies wurde als Pigmentverlust in den äußeren Thallusbereichen sichtbar. In 70‰-Medium und 105‰-Medium starben die Algen nach ca. 5-monatiger Kultur, in 175‰-Medium geschah dies schon nach 3 Monaten. Eine Kulturdauer von 2 Monaten in 175‰-Medium wurde ohne erkennbare Schäden überstanden, die anschließende Nachkultur in 35‰ ebenfalls.

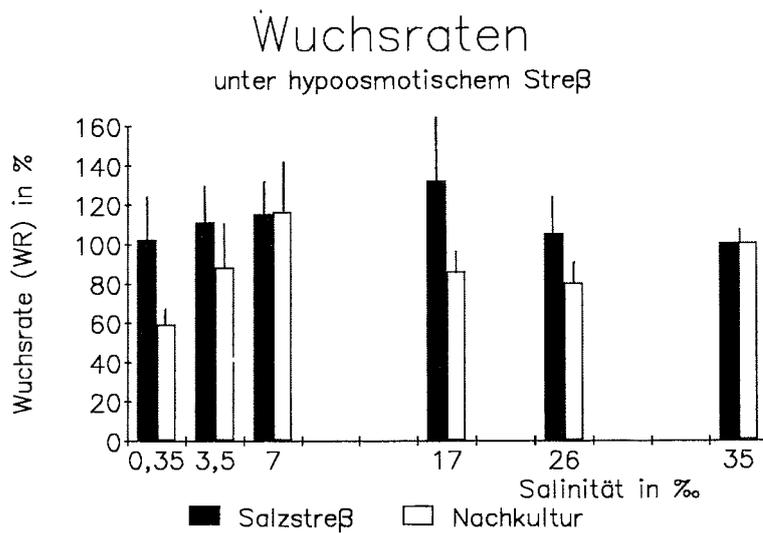
Bei der Färbung mit Neutralrot zeigte sich, daß die Außenwände des Thallus nur wenig Farbstoff direkt aus der Inkubationslösung aufnahmen. Die Färbung begann an den Schnittkanten des Präparates und setzte sich von dort in die zentralen Bereiche des Thallus fort.

3.1.2. Physiologie

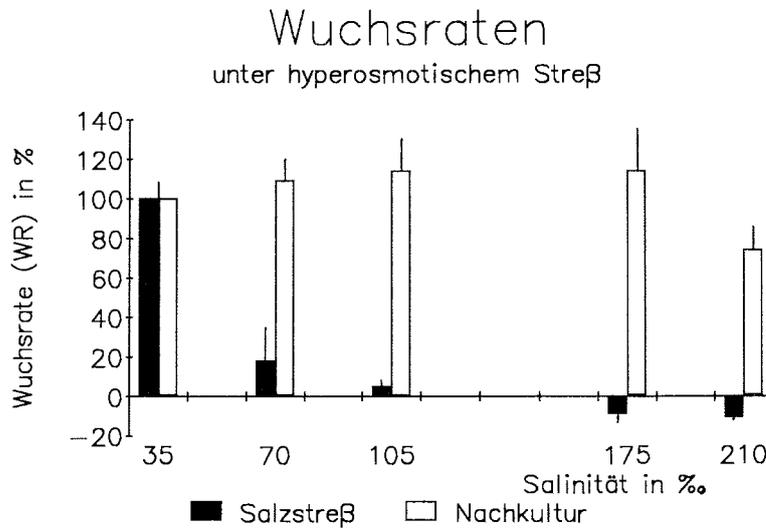
3.1.2.1. Wuchsraten (WR)

Unter hypoosmotischen Bedingungen (Grafik 1) kam es zu keiner Reduktion der WR, auch bei 0,35‰ (dies entspricht osmotisch Süßwasserbedingungen) betrug die WR noch 106%. Das Optimum für das Wachstum von *P. crispata* lag bei 17‰. Unter Salzkonzentrationen größer als 35‰ (Grafik 2) nahm das Wachstum rasch ab, bei Salinitäten über 105‰ war die WR negativ. Die negativen Wuchsraten waren auf den Wasserverlust der Thalli (vgl. 3.1.2.2.) zurückzuführen, wurden die WR hingegen auf den organischen Anteil des Trockengewichtes (vgl. Grafik 3) bezogen, so ließ sich auch in 175‰ noch ein geringes Wachstum nachweisen (in Grafik 1 und 2 nicht dargestellt, vgl. aber Anhang 3).

In der Nachkultur zeigten die fast alle hypoosmotisch vorbehandelten Proben WR unter 100%. Dies lag vermutlich daran, daß die Nachkultur hier einem osmotischen Upshock gleichkam. Die hyperosmotisch vorkultivierten Thalli zeigten dagegen nach der Rückführung in 35‰ Wuchsraten (WR) besser als 100%. Zum einen bedeutete die Nachkultur hier einen osmotischen Downshock, zum anderen war der Wassergehalt unter Salzstreß reduziert gewesen (vgl. Grafik 3) und wurde in der Nachkultur ausgeglichen. Lediglich in der 210‰-Kultur lag die WR der Nachkultur unter 100%. Da bei 210‰ einige Bestandteile des Mediums ausgefallen waren, ist nicht eindeutig zu entscheiden, ob die verminderte WR auf den osmotischen Streß



Grafik 1: Wuchsraten innerhalb von 14 Tagen in hypoosmotischen Kulturen und in der anschließenden 14-tägigen Nachkultur (35‰)



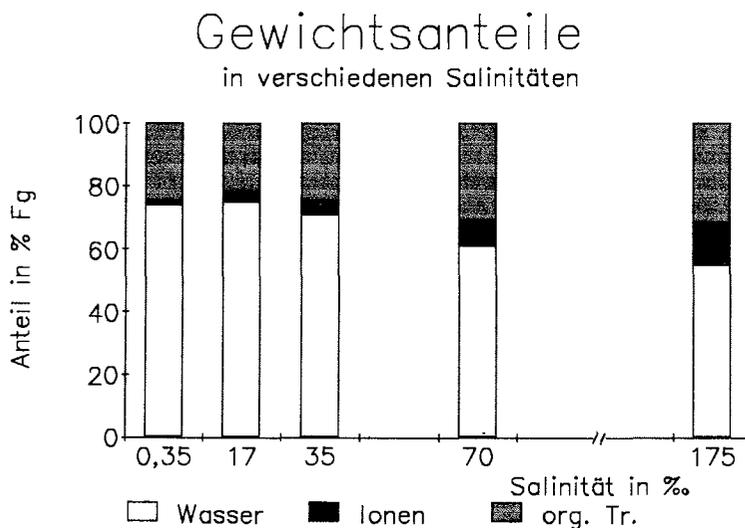
Grafik 2: Wuchsraten innerhalb von 14 Tagen in hyperosmotischen Kulturen und in der anschließenden 14-tägigen Nachkultur (35‰)

oder auf Mangelerscheinungen (Spurenelemente) zurückzuführen ist. Eine Schädigung der Thalli durch den vorausgegangenen osmotischen Stress war nicht zu erkennen. Anhand der WR wurden für alle folgenden Versuche 5 Salinitätsstufen ausgewählt:

- 0,35‰ : Stufe mit größtmöglichem hypoosmotischem Streß
- 17‰ : Stufe des optimalen Wachstums
- 35‰ : normale Meerwasserkonzentration (Vergleichswert)
- 70‰ : Stufe auf der die WR (bez. Fg) gerade noch positiv war
- 175‰ : Stufe mit größtmöglichem hyperosmotischem Stress.

3.1.2.2. Wassergehalt

Der Wassergehalt der Thalli (vgl. 2.2.4.) war unter hypoosmotischen Bedingungen relativ unverändert im Vergleich zur Normalkultur, das Maximum lag bei 17‰. Bei höheren Salinitäten dagegen nahm der Wassergehalt ab (vgl. Grafik 3); er verlief damit parallel zu den Wuchsraten (WR).



Grafik 3: Gewichtsanteile von Wasser, Ionen und organischer Trockensubstanz, gemessen in Thalli nach 14tägiger Kultur

3.1.2.3. Analyse der Inhaltsstoffe

Ionen:

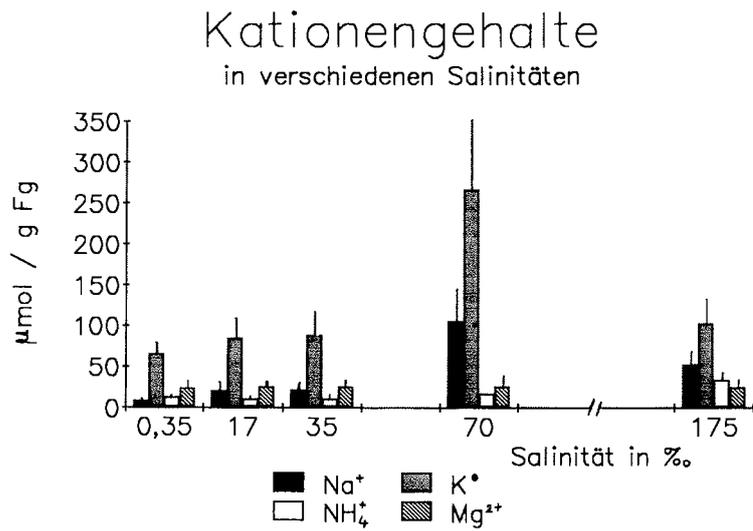
Die intrazellulären Konzentrationen von Na^+ und K^+ nach 14-tägiger Kulturdauer (Grafik 4) nahmen mit steigender Salinität zwischen 0,35‰ und 70‰ zu. Auffällig war dabei, daß bei der höchsten Salinität (175‰) die Konzentrationen geringer waren als in 70‰-Medium. Die K^+ -Konzentrationen lagen, besonders in den hypoosmotischen Medien, erheblich höher als die Na^+ -Konzentrationen. Allerdings änderten sich die K^+ -Konzentrationen nur um den Faktor 5, während die Steigerung in den Na^+ -Konzentrationen den Faktor 10 überschritt (zwischen 0,35‰ und 70‰). Der NH_4^+ -Gehalt stieg weniger stark an, hier lag das Maximum bei 175‰. Unverändert blieben dagegen die Konzentrationen der zweiwertigen Ionen Mg^{2+} und Ca^{2+} ; wobei die Ca^{2+} -Konzentration an der unteren Nachweisgrenze von 1 $\mu\text{mol/g}$ Fg lag.

Das wichtigste Anion war HPO_4^{2-} . Die Konzentrationen wurden als PO_4^{3-} bestimmt, wegen des intrazellulären pH-Wertes (vermutlich ca. pH 7 oder darüber), lag das Phosphat in den Zellen aber als HPO_4^{2-} vor. Die Gehalte änderten sich nur wenig, auch hier zeigte sich ein Maximum in 70‰ (Grafik 5). Die Cl^- -Konzentrationen waren überraschend gering und stiegen mit erhöhter Salinität um den Faktor 10 an. SO_4^{2-} lag an der unteren Nachweisgrenze von 1-2 $\mu\text{mol/g}$ Fg; NO_3^- ließ sich mit keiner der verwendeten Analysemethoden nachweisen.

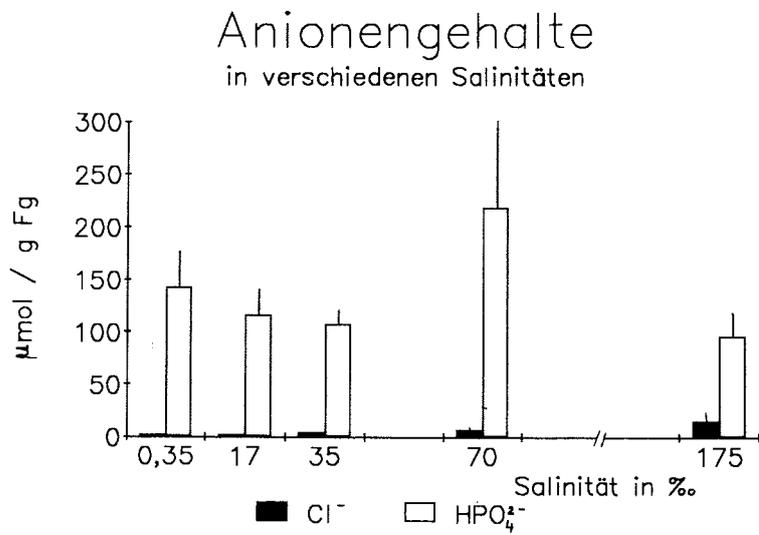
Die Anreicherung der Ionen Na^+ , K^+ und HPO_4^{2-} in den Zellen erfolgte gleichmäßig über die 14-tägige Kulturperiode in hypersalinen Medien (dargestellt für die 70‰-Kultur: Grafik 6). Lediglich unmittelbar nach dem Upshock kam es zu einer spontanen Änderung. Dabei stieg die Na^+ -Konzentration rasch an, die K^+ - und HPO_4^{2-} -Gehalte nahmen vorübergehend ab. Diese Änderungen entsprachen den Konzentrations-Gradienten zwischen Zelle und Medium.

Die Analyse ungewaschener Thalli (nach 14-tägiger Kultur) ergab, daß in der Zellwand große Mengen von K^+ angereichert wurden (Grafik 7). Diese Anreicherung erreichte im 0,35‰-Medium das 720-fache der Außenkonzentration (Grafik 8) und selbst im 175‰-Medium noch das 4-fache. In der 70‰-Kultur war der K^+ -Gehalt bei gewaschenen und ungewaschenen Thalli ungefähr gleich, die Zellwand enthielt also kein auswaschbares Kalium mehr.

Im Gegensatz dazu wurde Na^+ nur unter hypoosmotischen Bedingungen ein wenig angereichert; in höher konzentrierten Medien entsprach die Na^+ -Konzentration im ECS der des Mediums (Grafik 7 + 8).

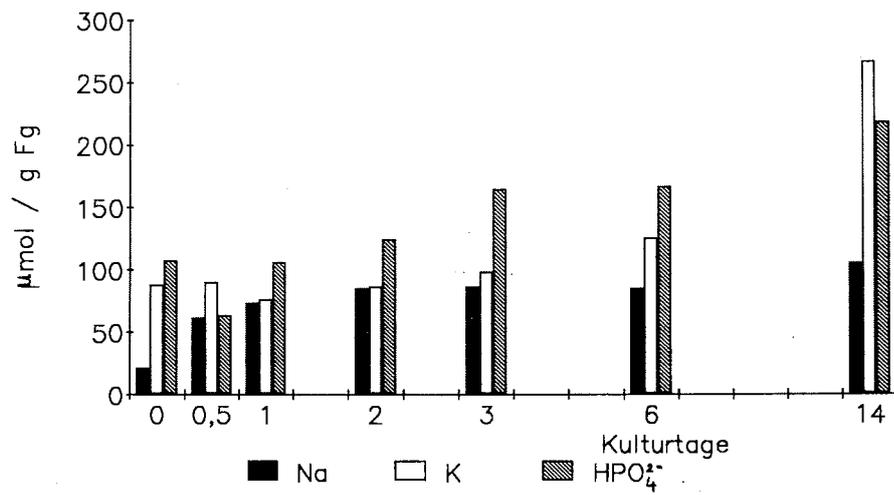


Grafik 4: Kationengehalte nach 14tägiger Kultur. Der ECS wurde vor der Analyse ausgespült.



Grafik 5: Anionengehalte nach 14tägiger Kultur. Der ECS wurde vor der Analyse ausgespült.

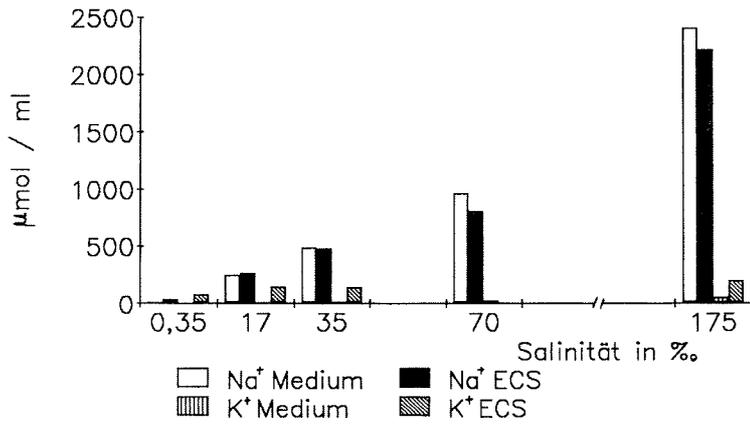
Ionenaufnahme in 70% während der 14-tägigen Kulturdauer



Grafik 6: Zeitverlauf der Ionenaufnahme während der 14tägigen Kultur in 70%.

Ionenkonzentrationen

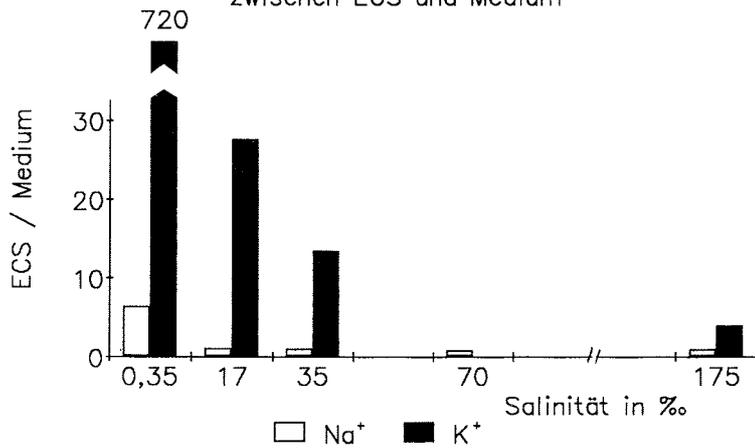
in ECS und Medium



Grafik 7: Konzentrationen von K⁺ und Na⁺ im ECS und im Kulturmedium, gemessen nach 14tägiger Kultur.

Quotient

zwischen ECS und Medium



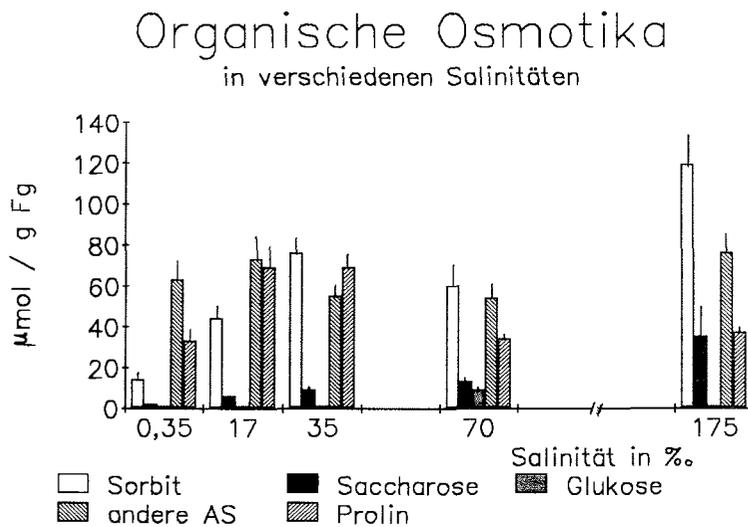
Grafik 8: Konzentrationsquotienten ECS/Medium für K⁺ und Na⁺, berechnet aus den Werten von Grafik 7

Organische Osmotika:

Die deutlichste Zunahme unter steigenden Salinitäten (nach 14-tägiger Kultur) zeigte der Sorbitgehalt der Proben (Grafik 9), die Saccharose-Konzentration nahm ebenfalls zu, war aber deutlich geringer als der Sorbitgehalt. Glukose ließ sich nur in der 70‰-Kultur in größeren Mengen nachweisen, sonst lag die Konzentration bei ca. $1 \mu\text{mol} / \text{g Fg}$.

Der Gehalt an freien Aminosäuren (ohne Prolin) war unter allen Salinitäten ungefähr gleich (Grafik 9). Dagegen zeigte Prolin ein Konzentrations-Maximum bei 17‰ und 35‰, hier war der Prolingehalt ebenso hoch, wie der aller anderen Aminosäuren zusammen.

Auf elektronenmikroskopischen Bildern (vgl. 3.1.3.2.) ließ sich zeigen, daß unter höheren Salinitäten der Stärkegehalt der Chloroplasten abnahm, unter hypoosmotischen Bedingungen wurden die Stärkekörner dagegen größer. Diese Veränderungen waren allerdings erst nach mehreren Wochen Kulturdauer deutlich zu erkennen. Thalli, die 8 Wochen in 175‰ kultiviert wurden, enthielten fast keine Stärke mehr; dies war auch mit einer JKJ-Färbung zu zeigen. Andere Thalli, die für 8 Wochen in 35‰ im Dunkel gehalten wurden, zeigten noch eine deutliche JKJ-Farbreaktion. Der Abbau der Stärke war also nicht allein auf den Ausfall der Photosynthese (vgl. 3.1.2.4.) zurückzuführen.



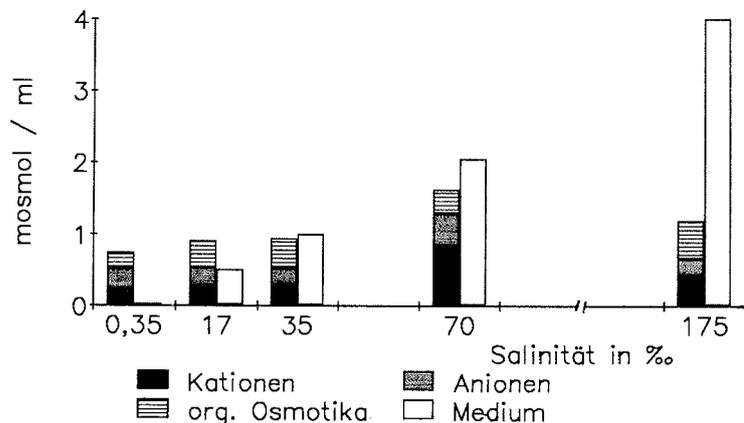
Grafik 9: Gehalte organischer Osmotika nach 14-tägiger Kultur.
(andere AS = alle Aminosäuren ohne Prolin)

Ebenfalls untersucht wurden die Gehalte an Dimethylsulphoniopropionat (DMSP), Glycerin und Ribit (Adonit). Keine dieser Substanzen konnte bei der chromatographischen Analyse (HPLC) in nennenswerten Mengen nachgewiesen werden (KARSTEN, pers. Mitteilung).

Kalkulation des osmotischen Potentials:

Die vorstehend beschriebenen Konzentrationen von Ionen und organischen Osmotika wurden verdoppelt (Berücksichtigung des 50%igen Zellwandanteils, vgl. 3.1.2.3.) und aufsummiert (Grafik 10). Im Vergleich mit den osmotischen Potentialen der verschiedenen Medien ergab sich nur in normalem Seewasser (35‰) ein ungefähr ausgeglichenes Verhältnis. In hypoosmotischen Medien zeigte sich ein Übergewicht des osmotischen Potentials im Protoplasten; der in 0,35‰ daraus resultierende Turgor betrug ca. 2,1 MPa. In 70‰ hatte das Kulturmedium ein etwas höheres Potential als der Protoplast, und in 175‰ überstieg das osmotische Potential des Mediums das des Protoplasten bei weitem.

Osmotische Potentiale in Protoplast und Medium

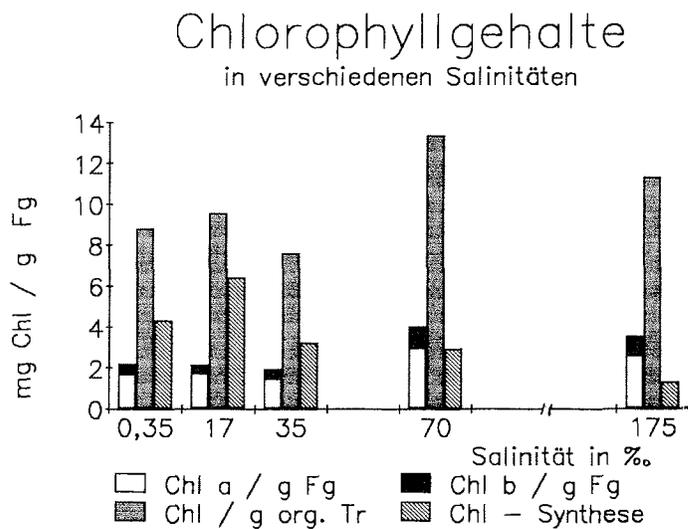


Grafik 10: Osmotische Potentiale nach 14tägiger Kultur. Berechnet aus den Konzentrationen, die in Grafik 4, 5 und 9 dargestellt sind.

Chlorophyll:

Die Chlorophyll-Konzentrationen je Gramm Frischgewicht (Grafik 11) waren nach 14-tägiger Kultur unter hypoosmotischen Bedingungen relativ unverändert. Dagegen kam es in der 70‰-Kultur zu einer Anreicherung von Chlorophyll. Der Konzentrationsanstieg bezogen auf das organische Trockengewicht war geringer, da sich der verringerte Wassergehalt der Thalli (vgl. Grafik 3) hier nicht bemerkbar machte.

Der Wassergehalt der Thalli beeinflusste die Darstellung der Chlorophyllgehalte. Da nicht entschieden werden konnte, ob scheinbar veränderte Chlorophyllgehalte nur eine Folge von Frischgewichts- und Wassergehaltsänderungen waren, wurde eine Modellrechnung zur Chlorophyllsynthese durchgeführt:



Grafik 11: Chlorophyllgehalte nach 14tägiger Kultur. Der Wert für die Chlorophyll-Synthese wurde durch Modellrechnung ermittelt (vgl. Text).

Ausgegangen wurde von 1 g Fg zu Anfang des Versuchs und einer relativen Wachstumsrate (RGR) von 7% entsprechend der Wuchsrates (WR) von 100%. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Wuchsrates für die verschiedenen Salinitäten ließ sich das Fg nach 14-tägiger Kultur errechnen. Die Kombination mit den o.a. Chlorophyllgehalten (je g Fg) ergab die absolute Chlorophyllmenge zu Kulturrende. Nach Abzug des Chlorophyllgehaltes zu Versuchsbeginn verblieb der Anteil, der innerhalb der 14-tägigen Kulturdauer neu synthetisiert wurde. Diese Chlorophyll-Synthese ist in Grafik 11 ebenfalls dargestellt. Sie war in 17‰ (Wachstumsoptimum) am produktivsten und nahm dann mit steigender Salinität ab; aber auch in 175‰ wurde noch Chlorophyll synthetisiert.

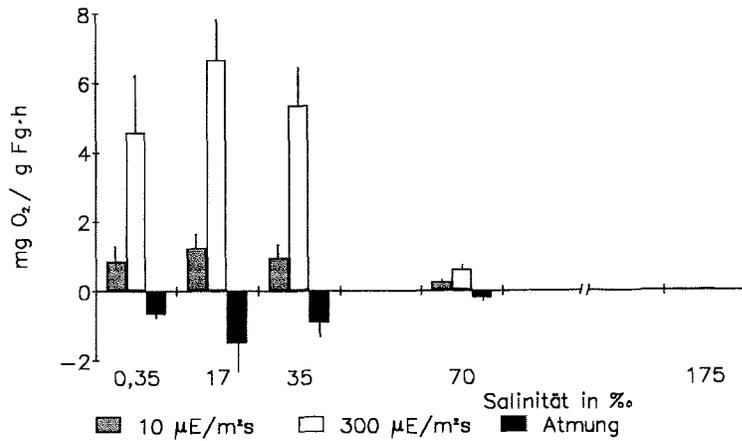
Der Anteil von Chlorophyll a blieb konstant bei ca. 80% des Gesamtchlorophylls.

3.1.2.4. Photosynthese und Atmung

Die Photosynthese- und Atmungsrates (Grafik 12) änderten sich nur wenig nach 14-tägiger Kulturdauer unter hypoosmotischen Bedingungen. Das Maximum lag (analog zu den Wuchsrates) bei 17‰, allerdings waren die Unterschiede in diesem Bereich nicht signifikant. Dagegen nahmen Photosynthese und Atmung in 70‰-Medium stark ab. Der Lichtkompensationspunkt bei ca. 10 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (Grafik 12) und der Bereich der Lichtsättigung bei Intensitäten $\geq 200 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (Grafik 13) wurden durch die unterschiedlichen Salinitäten offenbar nicht beeinflusst. In 175‰-Medium war nach 14 Tagen Kulturdauer weder Photosynthese noch Atmung feststellbar.

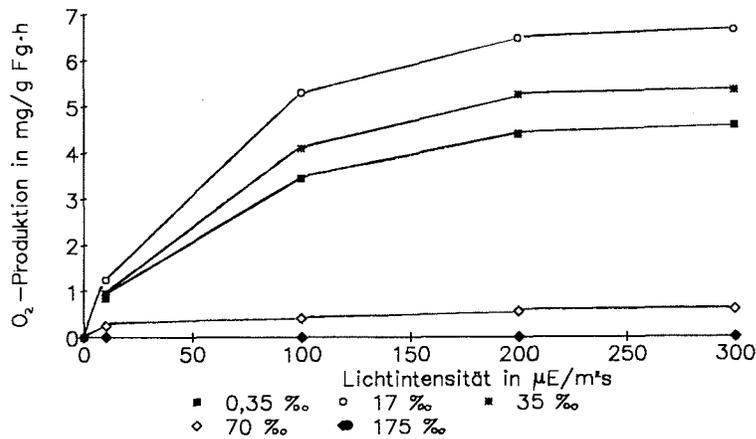
Nach dem osmotischen Upshock von 35‰ auf 175‰ waren beide Rates sofort stark reduziert und erholten sich innerhalb der folgenden Stunden nur wenig (Grafik 14). Beim osmotischen Downshock von 175‰ nach 35‰ (Grafik 15) setzte die Atmung sofort wieder mit ca. 1/3 der normalen Rate ein; die Photosyntheserate war wesentlich geringer. Beide Rates erholten sich in der Folgezeit kontinuierlich. Nach 3 Tagen war die Photosyntheserate wieder höher als die Atmungsrate, hatte aber erst 1/3 der Normalrate (35‰-Kultur) erreicht. Die Atmungsrate dagegen war schon auf über die Hälfte der Normalrate angestiegen.

Photosynthese und Atmung in verschiedenen Salinitäten



Grafik 12: Raten von Photosynthese und Dunkelatmung nach 14tägiger Kultur. (Photosyntheseraten = brutto, Atmungsverlust nicht abgezogen)

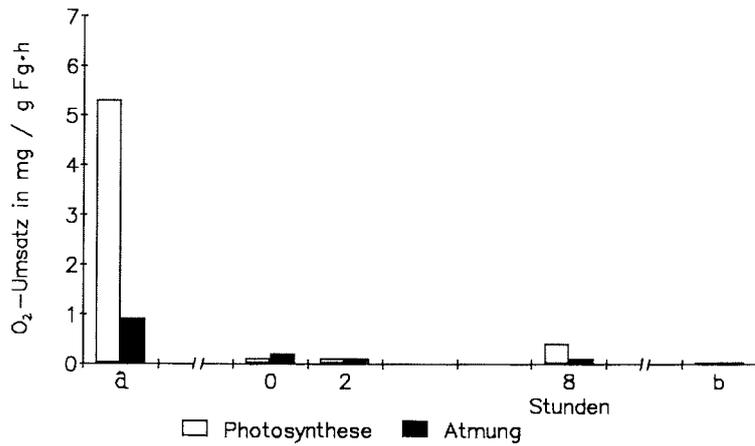
Photosynthese – Lichtkurven in verschiedenen Salinitäten



Grafik 13: Photosynthese-Lichtkurven nach 14tägiger Kultur. (Photosyntheseraten = brutto, Atmungsverlust nicht abgezogen)

Photosynthese und Atmung

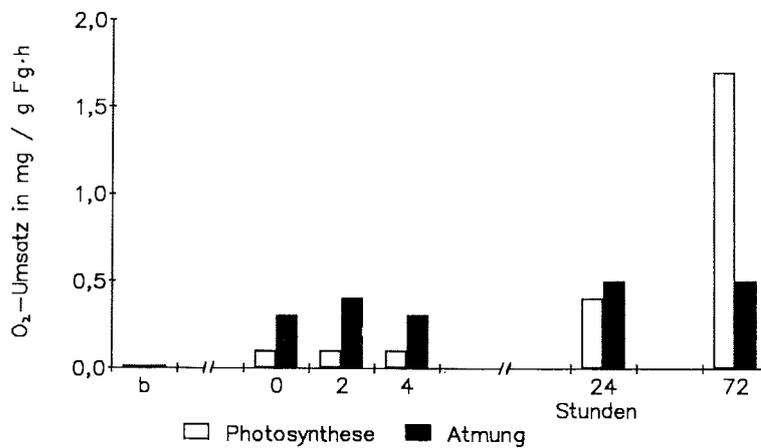
nach dem Upshock



Grafik 14: Photosynthese und Atmung unmittelbar nach dem Upshock von 35‰ auf 175‰. (a = Raten in 35‰, b = 14 Tage in 175‰)

Photosynthese und Atmung

nach dem Downshock



Grafik 15: Photosynthese und Atmung nach 14 Tagen in 175‰ (b) und anschließendem Downshock auf 35‰.

3.1.2.5. Thallusdehnung unter osmotischem Streß

Da aus technischen Gründen die Thallusdehnung nur in den zwei Richtungen der Thallusfläche beobachtet werden konnte, mußte auf die Änderung der Thallusdicke indirekt geschlossen werden. Umrechnungen unter Zuhilfenahme der Thallusdichte zeigten aber, daß die Dehnung (bzw. Kontraktion) relativ gleichmäßig in alle drei Richtungen verlief. Die Meßwerte wurden als prozentuale Änderung in einer Richtung angegeben, dabei entsprechen 100% der Länge des Thallus vor Versuchsbeginn.

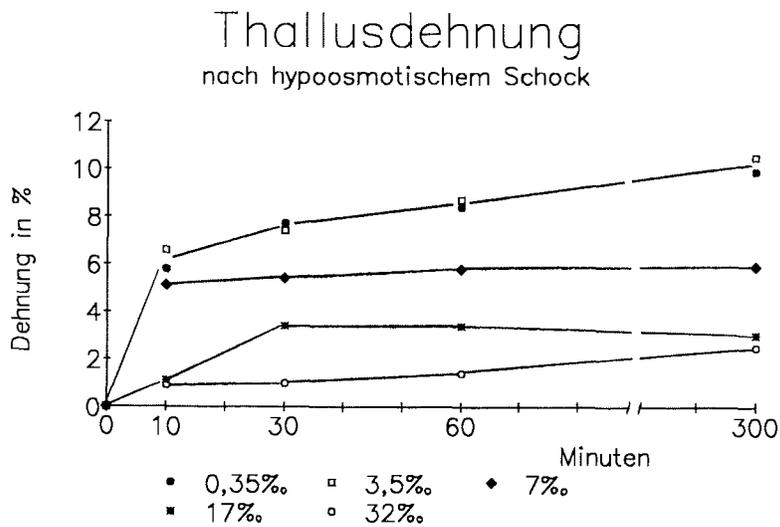
Die Inkubation in hypoosmotischen Medien führte zu einer Ausdehnung des Thallus (Grafik 16). Bei geringer Konzentrationsänderung war sie bereits nach 10 Minuten, bei Inkubation in 0,35‰ erst nach mehreren Stunden abgeschlossen. Das Maß der Thallusdehnung hing von der Stärke des Konzentrations-Unterschiedes ab; allerdings zeigte sich kein Unterschied zwischen 3,5‰ und 0,35‰; hier war vermutlich das maximale Dehnungsvermögen der Zellwände des Thallus erreicht.

Unter hyperosmotischen Bedingungen (Grafik 17) war die Kontraktion der Thalli sehr schnell abgeschlossen, auffällig war eine leichte Thallusdehnung nach Inkubation in 42‰-Medium.

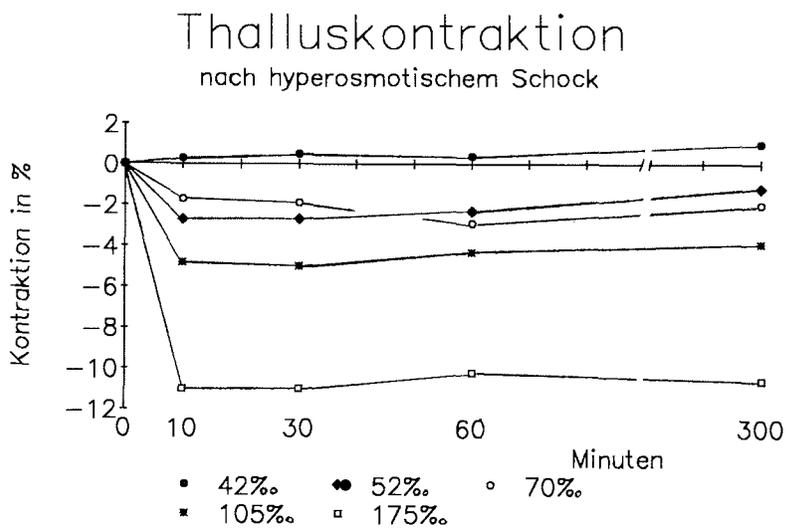
Die Zellwand abgetöteter Thalli (Grafik 18) war in 0,35‰ und in 175‰ inkubiert worden und zeigte in beiden Medien eine Kontraktion. Lediglich Detergenz- oder Ultraschall-behandelte Thalli dehnten sich bei Inkubation in 0,35‰.

3.1.2.6. Regulation des Thallusvolumens

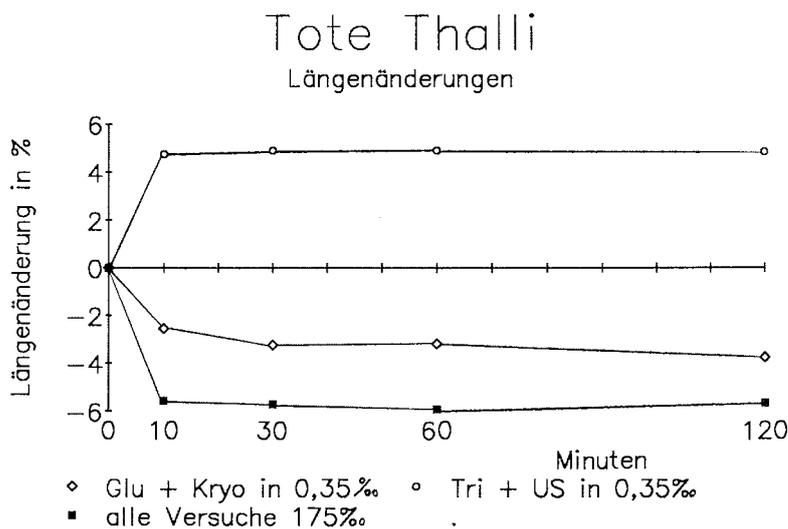
Unter hypoosmotischen Bedingungen war innerhalb von 5 Stunden nach dem Downshock der Thalli kein signifikanter Rückgang der Dehnung zu beobachten. Dagegen zeigte sich nach osmotischem Upshock auf Konzentrationen zwischen 52‰ und 105‰ ein leichter Rückgang der Kontraktion (Grafik 17). Dieser setzte nach 30 - 60 Minuten ein, glich aber nur einen Teil des Volumenverlustes aus. In 52‰ wurde maximal die Hälfte des Volumenverlustes ausgeglichen, in höher konzentrierten Medien nicht mehr als 1/3. In 175‰ wurde kein Rückgang der Thalluskontraktion beobachtet.



Grafik 16: Thallusdehnung nach Inkubation in hypoosmotischen Medien.
(Thalluslänge zu Beginn = 100%, positive Werte = Dehnung)



Grafik 17: Thalluskontraktion nach Inkubation in hyperosmotischen Medien.
(Thalluslänge zu Beginn = 100%, negative Werte = Kontraktion)



Grafik 18: Längenänderungen toter Thalli nach Inkubation in 0,35‰ und in 175‰. Die Werte mehrerer Versuchsreihen sind zu Mittelwerten zusammengefaßt (vgl. Anhang 3). (Thalluslänge zu Beginn = 100%, positive Werte = Thallusdehnung, negative Werte = Kontraktion)

Das Ausmaß der Volumenregulation zeigte keinen erkennbaren Zusammenhang zur Vorbehandlung der Thalli, d.h. die Beleuchtung vor und nach dem osmotischen Schock (vgl. 2.2.14.) hatte keine Auswirkung auf die Volumenregulation. Lediglich die Stärke des Upshocks beeinflusste den Rückgang der Kontraktion in der oben beschriebenen Weise.

Die Meßwerte unterlagen relativ hohen Schwankungen, so daß die Ergebnisse zur Volumenregulation statistisch unsicher sind. Trotzdem wurde in einigen Versuchen nach hyperosmotischer Belastung ein Rückgang der Thalluskontraktion gemessen, der signifikant oder sogar hoch signifikant war.

3.1.3. Ultrastruktur

3.1.3.1. Ultrastruktur in der Normalkultur (35‰)

Eine schematische Übersicht über die Ultrastruktur der Zellen von *P. crista* ist in Abb. 5 dargestellt. Die zylindrischen Protoplasten waren palisadenartig im einschichtigen Thallus von *P. crista* angeordnet, sie wurden von mächtigen Zellwänden umschlossen (Abb. 6).

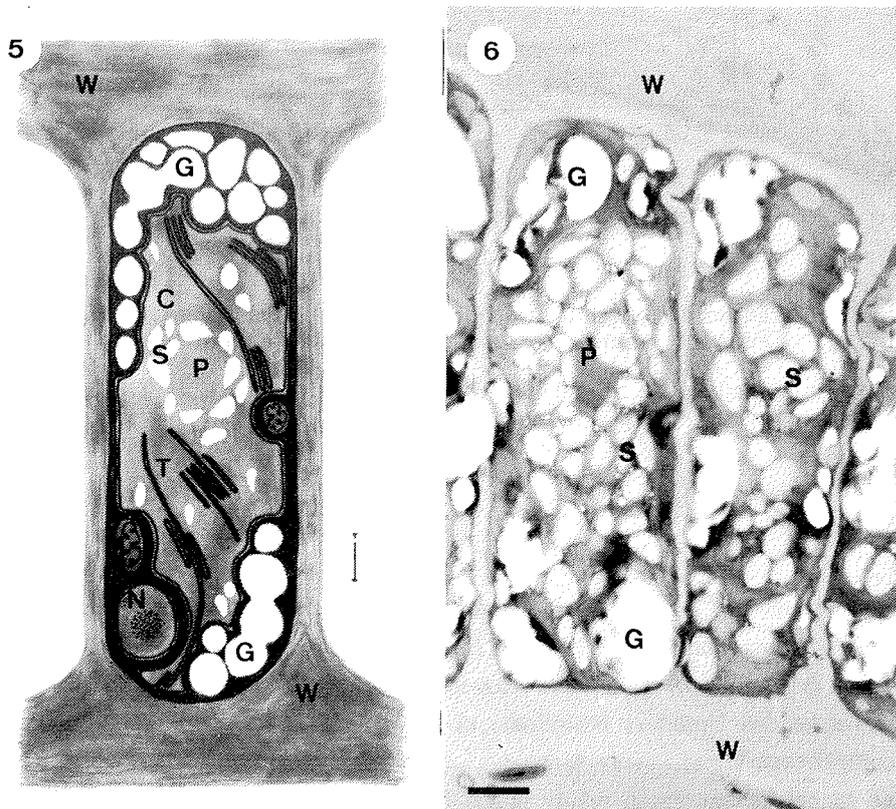


Abb. 5: Schemazeichnung einer Zelle (Thallusquerschnitt)
nach konventioneller Präparation

Abb. 6: Querschnitt durch einen Thallus
nach Nanoplast-Einbettung

C = Chloroplast, G = Globuli, M = Mitochondrium, N = Nucleus
P = Pyrenoid, S = Stärke, T = Thylakoide, W = Zellwand

Zwischen den Protoplasten betrug die minimale Dicke der Zellwand ca. $0,2 \mu\text{m}$, die Außenwände an der Thallusoberfläche waren ca. $2 \mu\text{m}$ dick (Abb. 7 + 8). Diese Zellwände zeigten häufig zwei verschiedene Schichten:

Unmittelbar am Protoplasten war eine Schicht, die im elektronen-mikroskopischen Bild sehr hell erschien (Abb. 6 + 9), ihre Dicke schwankte zwischen $0,2 \mu\text{m}$ und ca. $1,5 \mu\text{m}$. Abbauprobungen mit Pektinase und Pektinesterase zeigten, daß dieser innere Bereich der Zellwand zu einem großen Teil aus Pektinen bestand (Abb. 9 + 10).

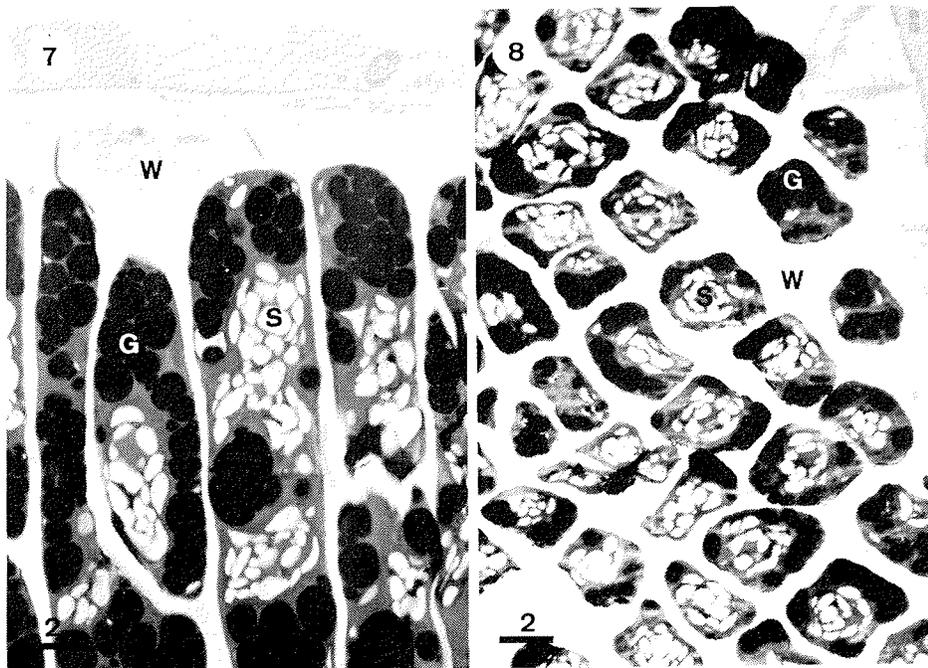


Abb. 7 + 8: Anordnung der Zellen im Thallus

7: Querschnitt durch einen Thallus (Protoplasten längs)

8: Flächenschnitt durch einen Thallus (Protoplasten quer)

G = Globuli, S = Stärke, W = Zellwand

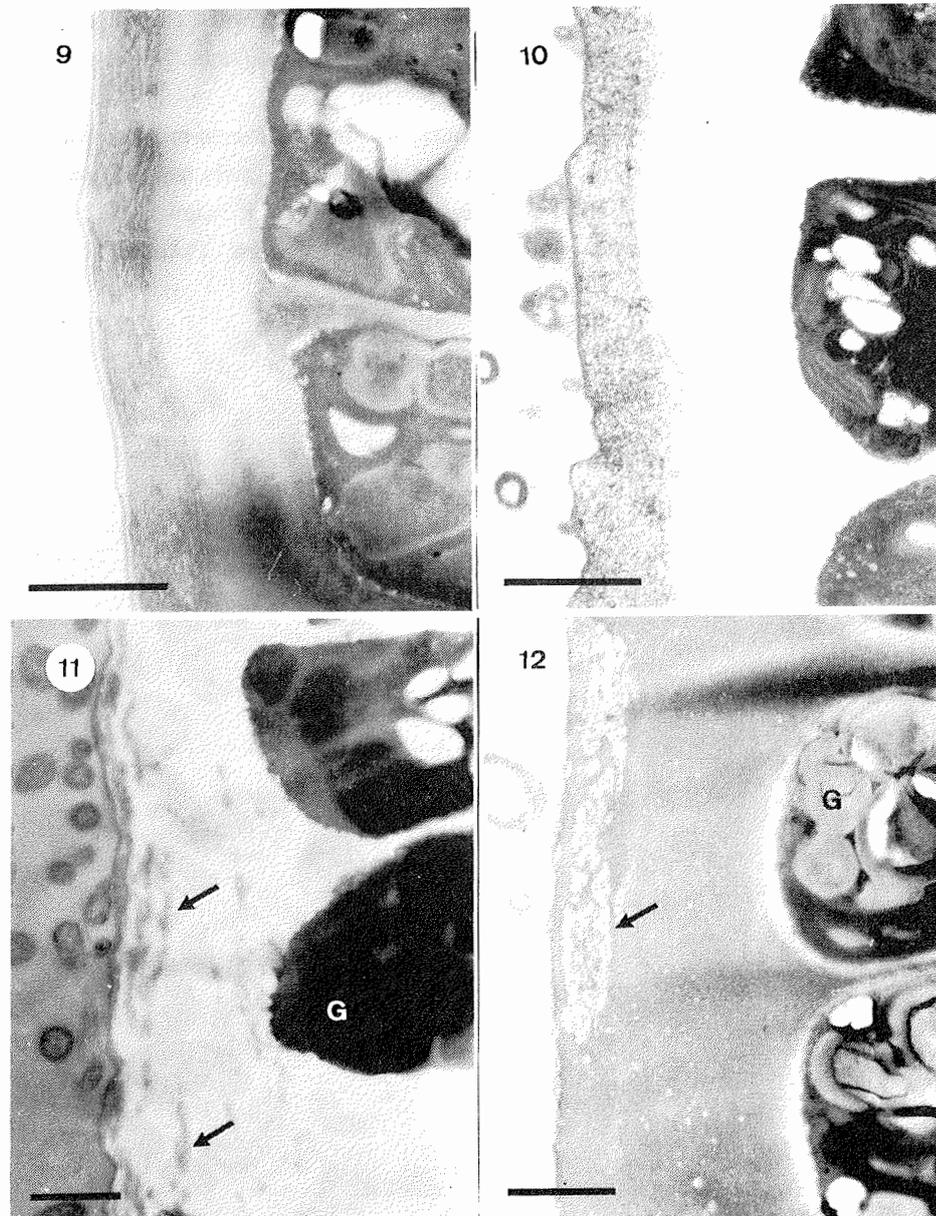


Abb. 9 - 12: Aufbau der Zellwände

9: Unbehandelte Zellwand (Spurr-Einbettung)

10: Zellwand nach Pektinase-Behandlung

11: Zellwand-Inkrusten (Pfeil) vor der Nachkontrastierung

12: Zellwand-Inkrusten (Pfeil) nach der Nachkontrastierung

G = Globuli

Die äußere Schicht der Zellwand an der Thallusoberfläche war stärker kontrastiert, sie wurde durch Pektinase nicht abgebaut (Abb. 9 + 10). Hier fanden sich häufig Einschlüsse, die vor der Nachkontrastierung dunkler, nach der Nachkontrastierung aber heller als die übrige Zellwand erschienen (Abb. 11 + 12).

In einigen Präparaten fehlte bei einer der Außenwände die äußere Schicht (Abb. 6 unten). Die innere, schwach kontrastierte Schicht war dann sehr viel dicker als an der anderen Thallusoberfläche. Wenn die innere Zellwandschicht einseitig dicker war, so war dies immer auf der Zellkern-Seite der Protoplasten (zur Lage der Zellkerne: siehe unten). Diese verstärkte innere Schicht war aber nur in einigen Präparaten zu sehen, so daß nicht generell zwei verschiedene Außenwände (Thallusober- und unterseite) identifiziert werden konnten. Darüber hinaus wurde die Ansicht der Zellwände durch die Schnittebene stark beeinflusst und eventuell verfälscht.

Den äußeren Abschluß der Zellwand bildete eine dünne Schicht, die den gleichen Kontrast wie die o.g. Einschlüsse zeigte. Sie war nach außen nicht scharf begrenzt, sondern schien sich allmählich vom Thallus abzulösen.

Fast das gesamte Protoplastenvolumen wurde von einem Chloroplasten eingenommen, so daß am Rande nur ein schmaler Cytoplasmasaum blieb. Im Chloroplasten waren zahlreiche Stärkekörner sichtbar. Sie umschlossen das Pyrenoid und lagen auch im übrigen Chloroplasten zwischen den Thylakoiden verteilt (Abb. 13). Die meisten Chloroplasten hatten nur ein zentrales Pyrenoid, selten wurden auch Chloroplasten mit zwei Pyrenoiden beobachtet (Abb. 14); dies war vermutlich ein Hinweis auf eine bevorstehende Zellteilung. Die Thylakoide waren wegen der dazwischenliegenden Stärkekörner und dem stark kontrastierten Chloroplasten-Stroma oft nur schwer zu erkennen; ebenso die Chloroplasten-Hüllmembran, die in den zahlreichen Auslappungen des Chloroplasten oft bis dicht an das Plasmalemma reichte. Sehr selten konnten auch Plastoglobuli zwischen den Thylakoiden identifiziert werden.

Im ebenfalls stark kontrastierten Cytoplasma erkannte man gelegentlich die Mitochondrien. Der Zellkern lag in einem Ende des länglichen Protoplasten, bedingt durch die antikline Zellteilungsebene immer am gleichen Ende des Protoplasten in einem Thallusstück. Oft waren im Zellkern Heterochromatin und der Nucleolus sichtbar (Abb. 14).

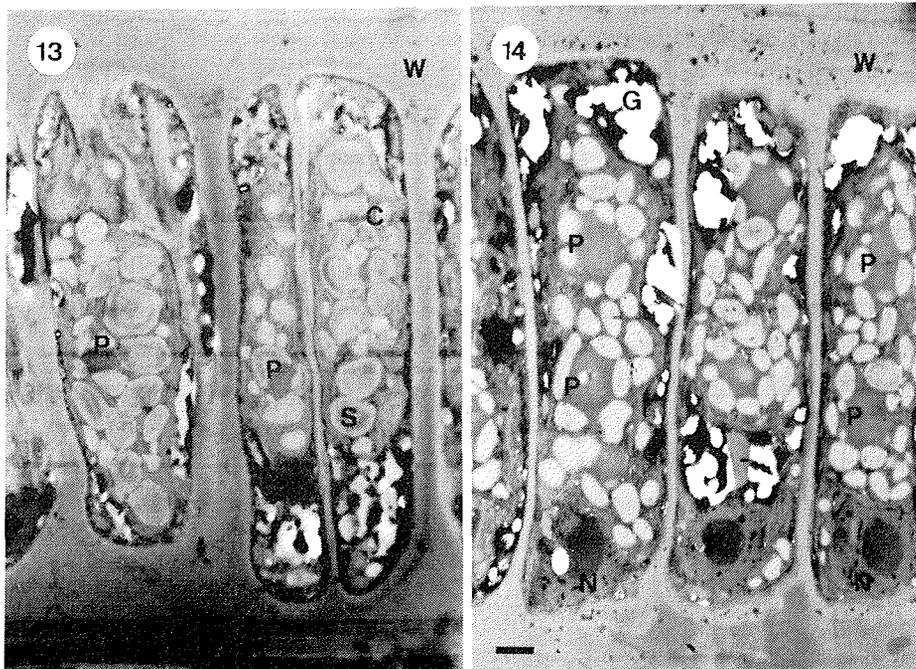


Abb. 13 + 14: Chloroplasten und Zellkerne

13: Chloroplasten mit 1 Pyrenoid

14: Chloroplasten mit 2 Pyrenoiden

C = Chloroplast, G = Globuli, N = Nucleus, P = Pyrenoid, S = Stärke,
W = Zellwand

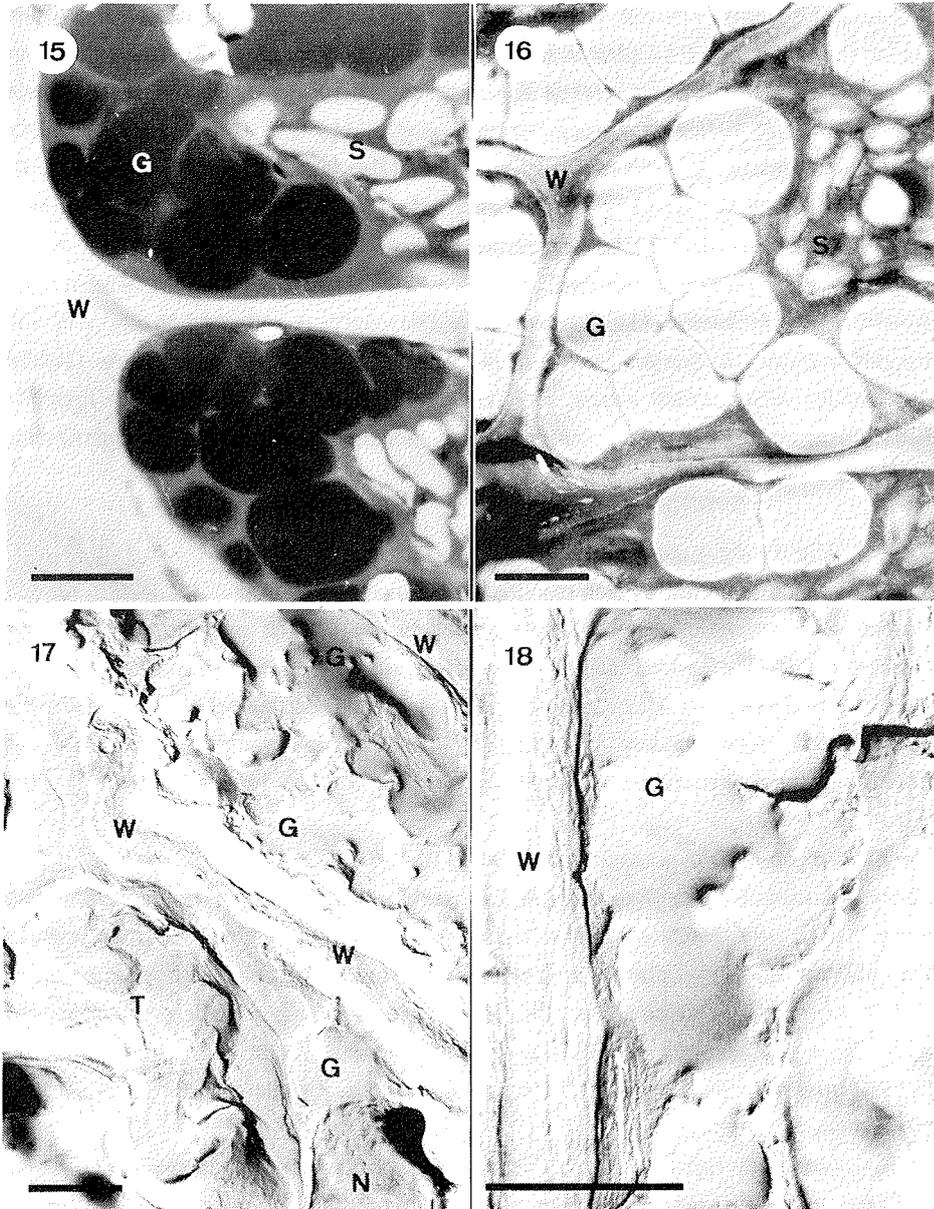


Abb. 15 - 18: Globuli im Cytoplasma

15: Osmium-fixierte Globuli vor dem Nachkontrast

16: Osmium-fixierte Globuli nach dem Nachkontrast

17: Gefrierbruch, Übersicht über zwei Zellen

18: Gefrierbruch an der Oberfläche der Globuli

G = Globuli, N = Nucleus, S = Stärke, T = Thylakoide, W = Zellwand

Auffällig war eine Vielzahl von lipophilen Globuli, die sich vornehmlich an den Enden des länglichen Protoplasten im Cytoplasma befanden (Abb. 7). Nach Osmium-Fixierung zeigten sie einen starken Kontrast, der allerdings durch die nachfolgende Behandlung mit Bleicitrat wieder verloren ging (Abb. 15 + 16, vgl. 3.3.). An Ultradünnschnitten wurde niemals eine umhüllende Membran dieser Globuli beobachtet. Um sie sicher gegen Vesikel oder Vakuolen abgrenzen zu können, wurden außerdem Gefrierbruch-Präparate hergestellt (Abb. 17 + 18). Auf diesen waren keinerlei Intramembran-Partikel an den Bruchflächen der Globuli sichtbar. Die Bruchflächen erschienen sehr glatt, wie eine Phasengrenze zwischen hydrophiler und lipophiler Phase. Außerdem bestätigte die Form, in der einige benachbarte Globuli miteinander verschmolzen waren, die Vermutung, daß es sich hier nur um lipophile Einschlüsse im Cytoplasma, nicht aber um membranumschlossene Kompartimente handelte.

3.1.3.2. Ultrastruktur unter Salzstreß

Veränderungen unmittelbar nach osmotischem Schock:

Proben, die innerhalb von 10 Minuten nach einem starken osmotischen Up- oder Downshock fixiert wurden, zeigten (abgesehen von der erodierten Stärke in 175^{0/00}) keine Veränderung der Ultrastruktur. Allerdings war eine zuverlässige Analyse der Membranen (insbesondere Thylakoide und Mitochondrien) wegen der unbefriedigenden Strukturhaltung der Proben (vgl. 3.1.3.5.) nicht möglich.

Veränderungen nach hypoosmotischer Kultur (0,35^{0/00}):

Unter hypoosmotischen Bedingungen änderte sich die Ultrastruktur der Zellen nur wenig (Abb. 19). Nach 14 Tagen war gelegentlich eine leichte Vergrößerung der Stärkekörner im Chloroplasten zu beobachten. Nach 4 Wochen in hypoosmotischer Kultur (Abb. 20) waren dann die Stärkekörner jedoch deutlich angewachsen. Abb. 21 + 22 zeigen einen Thallus nach 30 Wochen in 0,35^{0/00}; hier waren die Stärkekörner enorm vergrößert. Vermutlich waren jeweils mehrere Stärkekörner zusammengewachsen.

Weitere Veränderungen in der Ultrastruktur konnten nach hypoosmotischer Kultur nicht beobachtet werden.

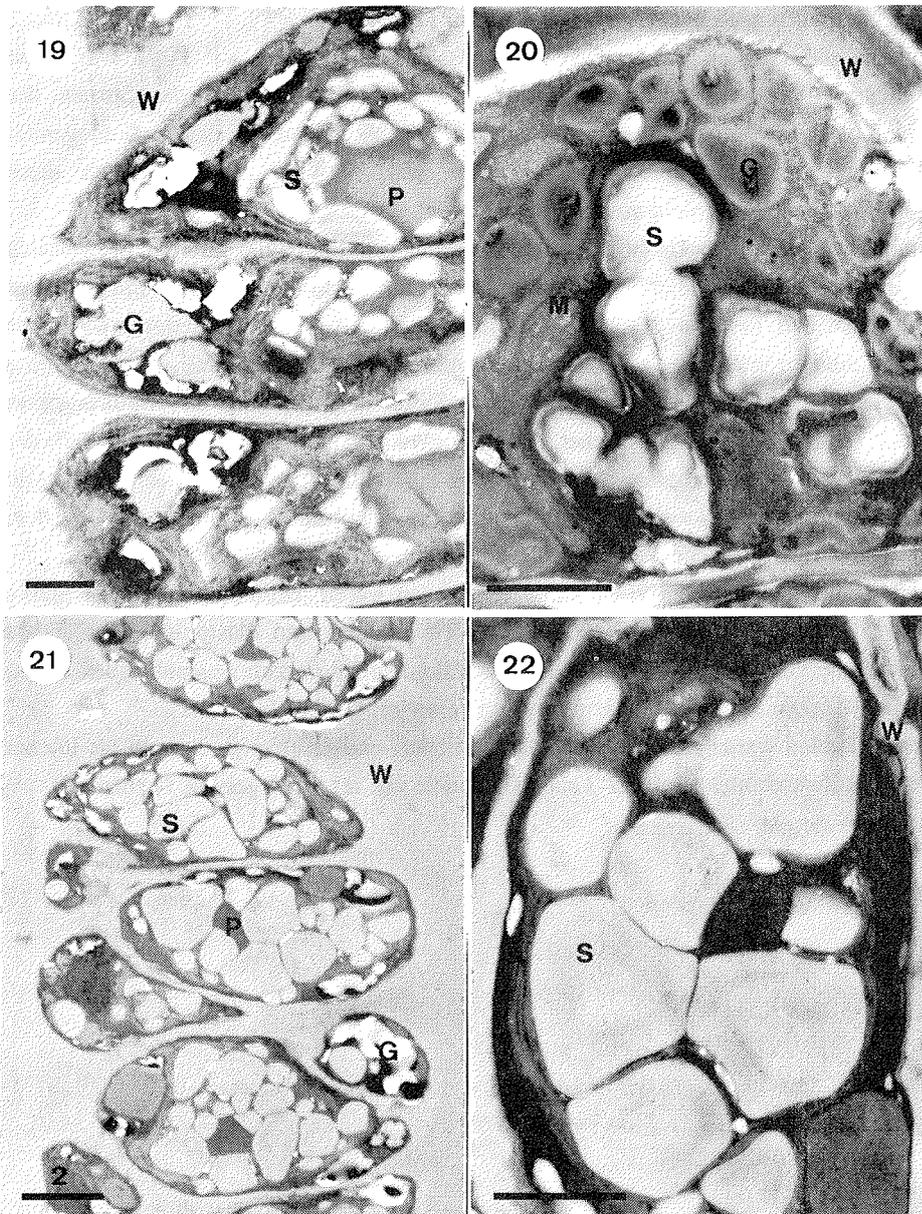


Abb. 19 - 22: Veränderungen nach hypoosmotischer Kultur

19: nahezu unveränderte Stärke nach 14 Tagen in 0,35‰

20: leichte Zunahme der Stärke nach 4 Wochen in 0,35‰

21: Thallus nach 30 Wochen in 0,35‰

22: Ausschnitt aus Abb. 21: stärkegefüllter Chloroplast

G = Globuli, M = Mitochondrien, P = Pyrenoid, S = Stärke, W = Zellwand

Veränderungen nach hyperosmotischer Kultur (70‰):

Innerhalb des ersten Tages nach der Aufsalzung von 35‰ auf 70‰ war keine eindeutige Veränderung der Ultrastruktur feststellbar. Lediglich das Stroma der Chloroplasten erschien in dieser Zeit gelegentlich inhomogen. Da diese Inhomogenität nur nach Nanoplast-Einbettung erkennbar war, ist ein Artefakt durch diese Präparationsmethode nicht auszuschließen.

Einen Tag nach dem Upshock waren zwischen den lipophilen Globuli gelegentlich kleine Vakuolen sichtbar. Ihre Anzahl und ihr Volumen nahmen mit längerer Kulturdauer in 70‰ zu. Nach 7 Tagen in 70‰ waren im Chloroplasten etwas mehr Thylakoide zu erkennen, zwischen ihnen waren häufig Plastoglobuli sichtbar. Diese Anreicherung von Thylakoiden und Plastoglobuli erschien nach 14 Kulturtagen in 70‰ (Abb. 23) noch deutlicher, was möglicherweise auch daran lag, daß der Stärkegehalt der Chloroplasten zu dieser Zeit bereits leicht reduziert war. Die Anzahl der Vakuolen hatte weiter zugenommen. Im Cytoplasma konnten entlang dem Plasmalemma zahlreiche Vesikel beobachtet werden (Abb. 24).

Zellen, die 3 Monate bei 70‰ kultiviert worden waren, enthielten fast keine Stärke mehr. Dadurch trat die Anreicherung von Thylakoiden und Plastoglobuli besonders deutlich hervor. Anzahl und Volumen der Vakuolen hatten sich gegenüber den Zellen nach 14-tägiger Kultur offenbar nur wenig verändert (Abb. 25 + 26).

Die Vakuolen waren fast nie vom Plast infiltriert und erschienen deshalb als Löcher im Ultradünnschnitt. Auch der Tonoplast konnte nur selten dargestellt werden.

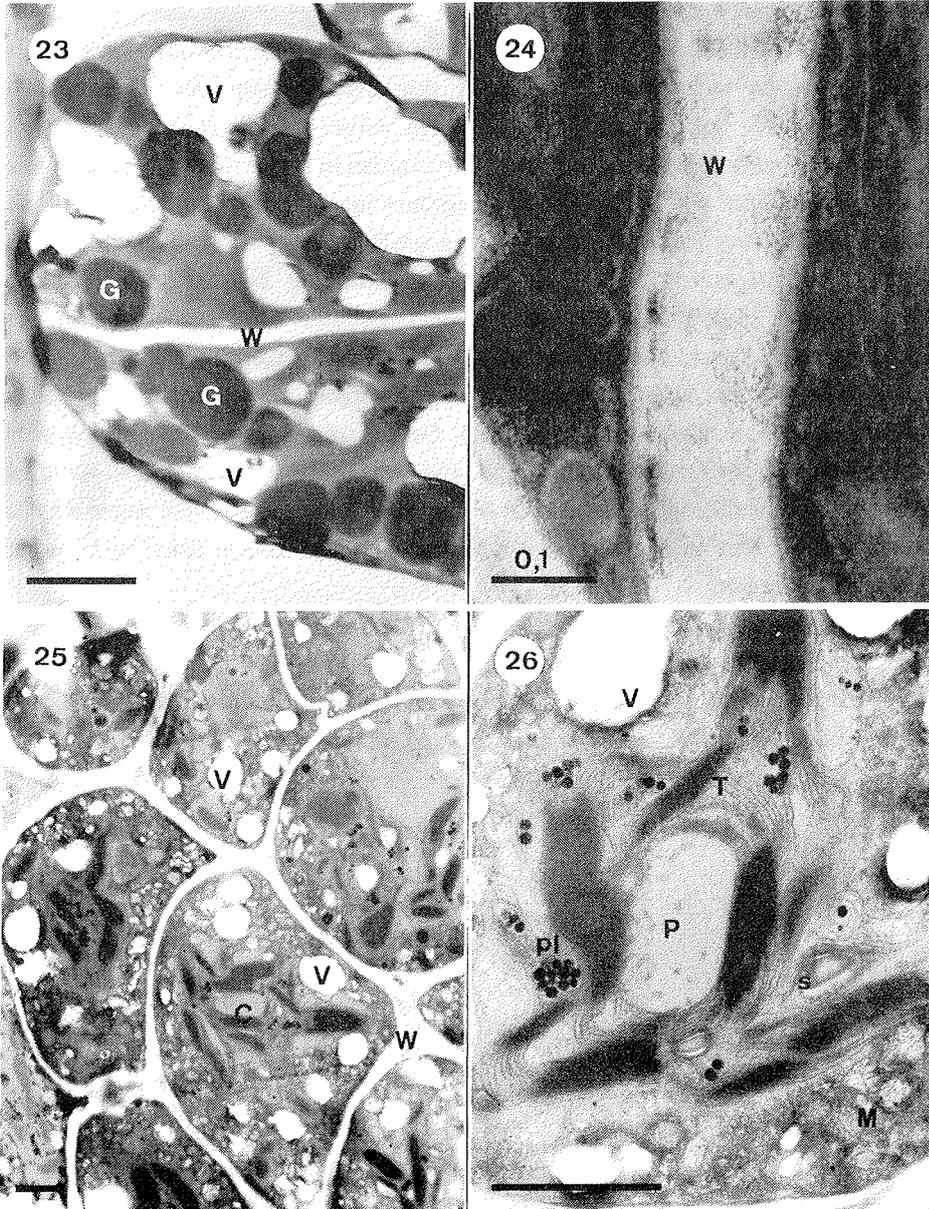


Abb. 23 - 26: Veränderungen in 70^o/_{oo}-Kultur

23: Vakuolen nach 14 Tagen in 70^o/_{oo}

24: Vesikel (↖) am Plasmalemma nach 14 Tagen in 70^o/_{oo}

25: Thallus nach 3 Monaten in 70^o/_{oo} (Flächenschnitt)

26: Ausschnitt aus 25: fast stärkefreier Chloroplast

C = Chloroplast, G = Globuli, P = Pyrenoid, pl = Plastoglobuli,
S = Stärke, V = Vakuole, W = Zellwand

Veränderungen nach Kulturhaltung in 175^{0/00}:

In einigen Präparaten, die 10 Minuten nach dem Upshock von 35^{0/00} auf 175^{0/00} fixiert wurden, zeigten sich Veränderungen an den Stärkekörnern der Chloroplasten (Abb. 27 + 28). Stark kontrastierte Strukturen waren auf fast allen Stärkekörnern (und nur dort) zu sehen. Diese Erosionsspuren wurden in später fixierten Proben nicht mehr gefunden. Das Chloroplasten-Stroma erschien inhomogen (vgl. oben, 70^{0/00}), die übrige Ultrastruktur erschien unverändert gegenüber dem Normalzustand (35^{0/00}). Auch in den folgenden Tagen blieb die Ultrastruktur der Zellen fast unverändert. Nach 7 Tagen in 175^{0/00} waren etwas mehr Thylakoide und Plastoglobuli in den Chloroplasten sichtbar, der Stärkegehalt erschien leicht reduziert. Vakuolen konnten erstmals 14 Tage nach dem Upshock beobachtet werden, sie waren aber sehr selten (anders als nach 14 Tagen in 70^{0/00}-Kultur). Der Stärkegehalt war nach 14 Tagen in vielen Zellen deutlich reduziert (Abb. 29). Hier war offenbar in den 175^{0/00}-Kulturen weniger Stärke verblieben als in den 70^{0/00}-Kulturen. Der Stärke-Gehalt zeigte aber in benachbarten Zellen gelegentlich große Unterschiede und konnte daher nicht sicher quantifiziert werden.

Nach 8-wöchiger Kultur in 175^{0/00} war keine Stärke mehr in den Chloroplasten; Thylakoide und Plastoglobuli waren zahlreich und gut zu erkennen. Zwischen den Globuli lagen jetzt viel mehr Vakuolen als nach 14-tägiger Kultur; ihre Anzahl und ihr Volumen entsprachen ungefähr dem Zustand, der in 70^{0/00} schon nach 14-tägiger Kultur erreicht worden war (Abb. 30).

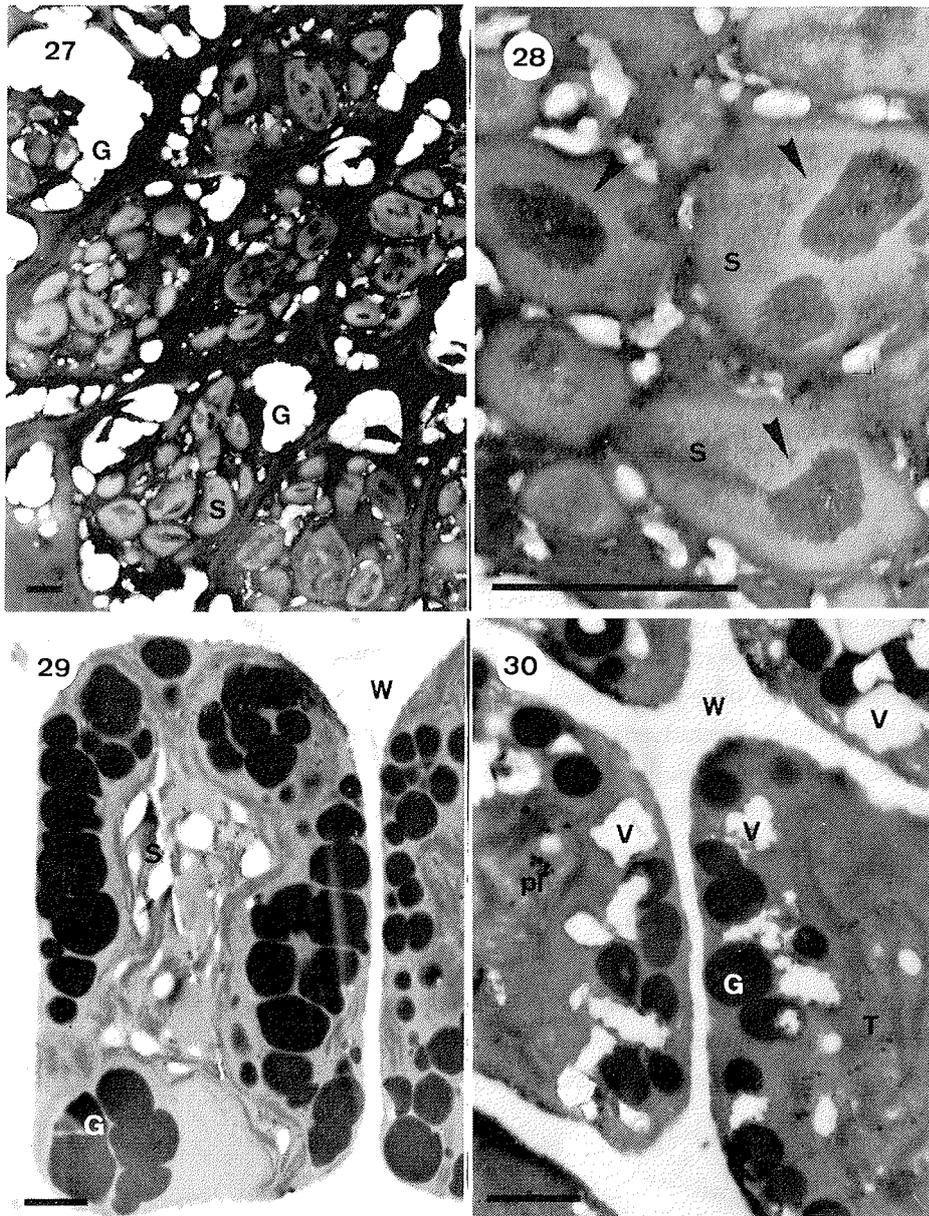


Abb. 27 - 30: Veränderungen in 175⁰/₀₀-Kultur

27: Präparat unmittelbar nach dem Upshock auf 175⁰/₀₀

28: Ausschnitt aus 27: Stärkekörner mit Erosionsspuren (◄)

29: 14 Tage in 175⁰/₀₀: weniger Stärke, keine Vakuolen

30: 2 Monate in 175⁰/₀₀: keine Stärke, Vakuolen im Cytoplasma

G = Globuli, pl = Plastoglobuli, S = Stärke, T = Thylakoide, V = Vakuole,
W = Zellwand

3.1.3.3. Strukturänderungen in der Nachkultur

Nach 14-tägiger Kultur unter 70‰ oder 175‰ wurden die Thalli in normales Medium (35‰) zurückgesetzt (Nachkultur). In den ersten 4 Tagen dieser Nachkultur waren die o.g. Veränderungen der Ultrastruktur durch den vorangegangenen Salzstreß noch zu erkennen, aber nach 7 Tagen Nachkultur bestand fast kein Unterschied mehr zur normalen Ultrastruktur. Lediglich die Anzahl der Thylakoide und der Plastoglobuli schien noch geringfügig erhöht zu sein. An den lipophilen Globuli konnte sowohl unter osmotischem Streß als auch in der Nachkultur keinerlei Veränderung festgestellt werden.

3.1.3.4. Elementnachweis mit EDXA und EELS-Technik

In einer Probe der 0,35‰-Kultur wurde mit der EELS-Technik (Electron-Energy-Loss-Spectroscopy) Phosphor nachgewiesen. Im Cytoplasma der Zellen befanden sich eng begrenzte Bereiche (Abb. 31 + 32), in denen die Phosphor-Konzentration vermutlich zwischen 0,1 und 1 molar betrug (Grafik 19 + 20). Häufig waren an diesen Stellen auch Löcher im Ultradünnschnitt. Eine umhüllende Membran konnte nicht dargestellt werden. Wegen des schlechten Bildkontrastes der EELS-Präparate (50 nm-Schnitte, ohne jede Schwermetall-behandlung) wurden die Abb. 31 + 32 mit der ESI-Technik kontrastverstärkt.

In keiner anderen Probe ließen sich Phosphor, Natrium oder Chlor, also die Ionen, die unter Salzstreß in den Thalli angereichert wurden, nachweisen. Da die Vakuolen, in denen die angereicherten Ionen vermutet wurden, meistens vom Plast nicht infiltriert wurden, konnten in diesen Bereichen keine Messungen durchgeführt werden. Auch in der Zellwand, die zumindest in den hypersalinen Proben erhebliche Mengen an Ionen enthielt, war ebenfalls kein Nachweis möglich. Entsprechendes gilt auch für die Vesikel, die in der 70‰-Kultur beobachtet wurden (Abb. 24).

Schwefel war in den Zellwänden ebenfalls nicht nachweisbar, dies bestätigte die Ergebnisse der chemischen Analyse (vgl. 3.1.2.3.).

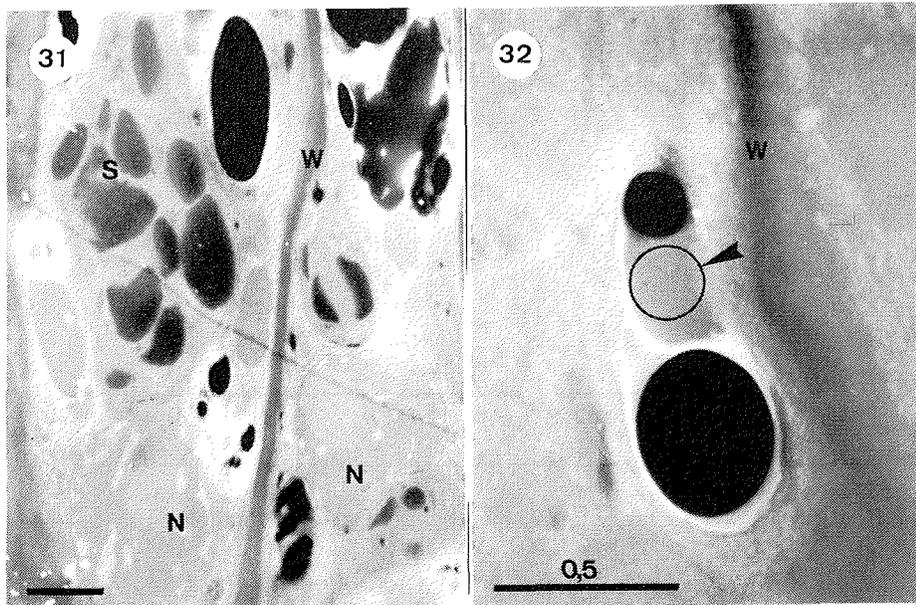


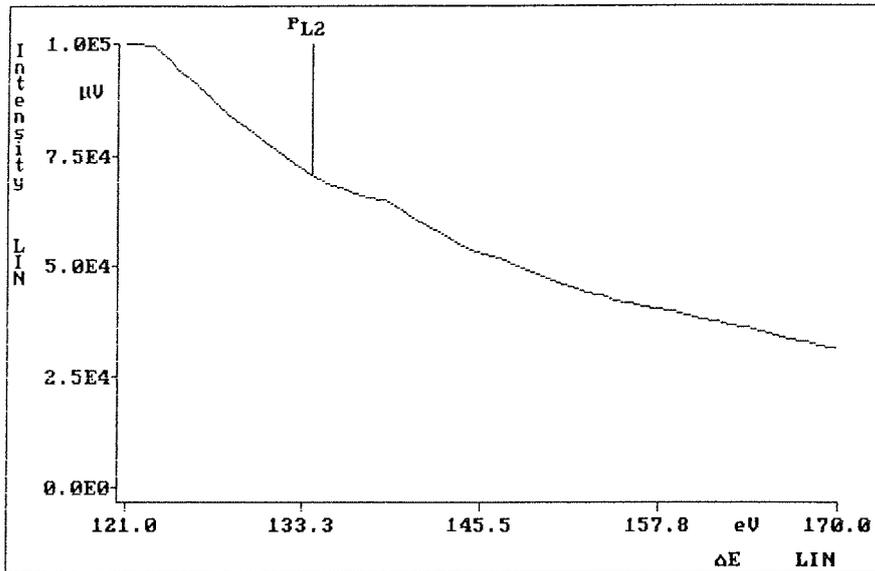
Abb. 31 + 32: Präparat der 0,35‰-Kultur, unkontrastiert zum Phosphor-Nachweis mit der EELS-Technik

31: Übersicht über 2 untersuchte Zellen

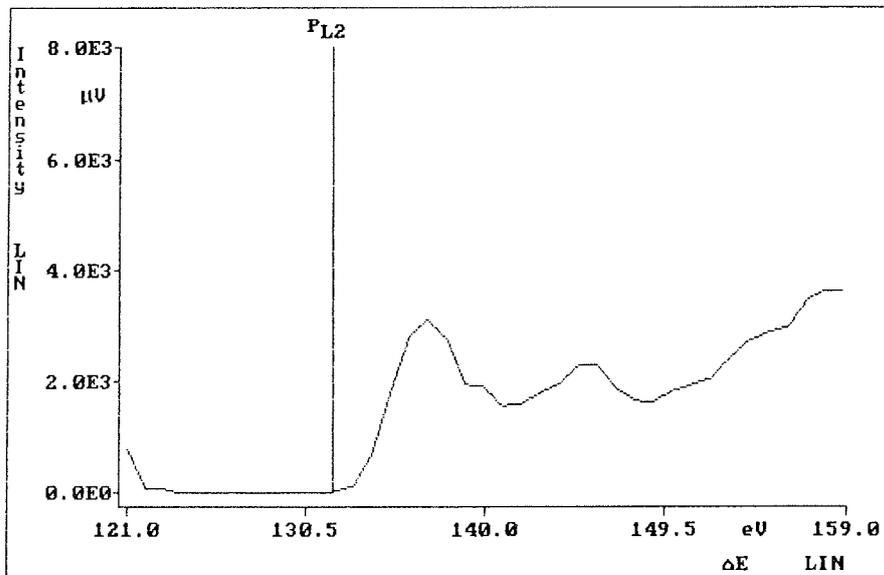
32: Der Meßbereich im Cytoplasma ○◀

beide Abbildungen sind durch die ESI-Technik kontrastverstärkt
($\Delta E = 240 \text{ eV}$) N = Nucleus, S = Stärke, W = Zellwand

Der Versuch, die angereicherten Ionen (vgl. 3.1.2.3.) mit Hilfe der energiedispersiven Röntgenmikroanalyse (EDXA) zu lokalisieren, blieb leider erfolglos. Die Vakuolen, in denen hohe Salzkonzentrationen vermutet wurden, waren zu klein, um sie mit der EDXA untersuchen zu können. Die geringe Größe der Zellen erschwerte die Unterscheidung der verschiedenen Zellbestandteile. Außerdem gab es bei der Präparation der Thalli vielfältige technische Probleme, die hier nicht näher diskutiert werden sollen.



Grafik 19: EELS-Spektrum an der in Abb. 32 bezeichneten Stelle in einem Präparat der $0,35^{0/00}$ -Kultur



Grafik 20: Subtraktionsspektrum aus Grafik 19, der bezeichnete Peak zeigt im Präparat enthaltenen Phosphor an. (vgl. Abb. 31 + 32)

3.1.3.5. Qualität der elektronenmikroskopischen Präparation

Die Qualität der elektronenmikroskopischen Präparate war oftmals nicht befriedigend. Das Hauptproblem bestand in der ungenügenden Einbettung der Präparate; vor allem die Vakuolen der hypersalin kultivierten Thalli waren meistens nicht vollständig mit Plast infiltriert. In anderen Bereichen war der Plast nicht ausreichend durchgehärtet, so daß die Präparate beim Schneiden zerrissen. Insbesondere die Stärkekörner und die Zellwand waren oft härter als die anderen Zellbestandteile, die dadurch beim Schneiden stark beschädigt wurden. Es wurde deshalb anfangs versucht, durch die Wahl anderer Einbettungsmedien (z.B. unterschiedlich harte Zusammensetzungen von Spurr's Medium oder die extrem dünnflüssige Variante "ultra low"), sowie durch verlängerte Infiltrationszeiten (HALLAM & LUFF, 1988) die Einbettung zu verbessern. Diese Bemühungen zeigten keinen Erfolg. Eine weitere Überlegung war, daß keine vollständige Entwässerung stattgefunden habe und die Infiltration durch Reste einer wässrigen Phase behindert würde. Dies könnte vor allem auf die Vakuolen zutreffen. Trotz der Versuche, die vollständige Entwässerung der Thalli sicherzustellen (vgl. 2.3.6.), konnte aber keine entscheidende Verbesserung der Einbettung erreicht werden. In einer dritten Versuchsserie wurde die Zellwand enzymatisch entfernt, um dadurch den Zugang des Einbettungsmittels in das Zellinnere zu erleichtern. Leider zeigte sich hier, daß eine eindeutige Verbesserung der Einbettung erst dann erreicht wurde, wenn die Zellwand fast vollständig aufgelöst und die Ultrastruktur der Protoplasten bereits beeinträchtigt war. Kontrollversuche ergaben, daß die Schäden am Protoplasten zum Teil auf die Enzymwirkung, zum Teil aber auch auf den pH-Wert des MES-Puffers (pH 5,5) zurückzuführen waren. Durch die Behandlung mit Pektinesterase bei pH 7,5 wurde die Zellwand nur teilweise abgebaut, die Einbettung war nicht verbessert.

Relativ gute Einbettungs-Ergebnisse zeigte dagegen das wassermischbare Einbettungsmittel Nanoplast. Die Proben waren meist gut von Plast durchdrungen und ließen sich gut schneiden. Der wichtigste Nachteil lag darin, daß die Proben nicht mit OsO₄ behandelt werden durften und daher trotz Nachkontrastierung nur einen geringen Kontrast zeigten. Die Blockkontrastierung mit Uranylacetat konnte diesen Nachteil nur teilweise ausgleichen. Außerdem wurden die lipophilen Globuli teilweise nicht vom Einbettungsmittel infiltriert, so daß hier Löcher in den Ultradünnschnitten auftraten.

Wichtige Vorteile der Nanoplast-Einbettung bestanden im sehr geringen Arbeitsaufwand und in der Möglichkeit, ohne wässrige Fixierung und Aceton-Entwässerung einzubetten; dies war für die Untersuchung der Ultrastruktur an getrockneten Thalli besonders wichtig. Die Einbettungs-Ergebnisse nach vorheriger Austrocknung (Nanoplast- und konventionelle Präparation) waren aber deutlich schlechter als bei befeuchteten Thalli. Die Plast-Blöckchen waren oft bröckelig, dadurch entstanden teilweise sehr große Löcher im Präparat. Die herausgebrochenen Partikel verursachten häufig Scharten in den Ultradünnschnitten.

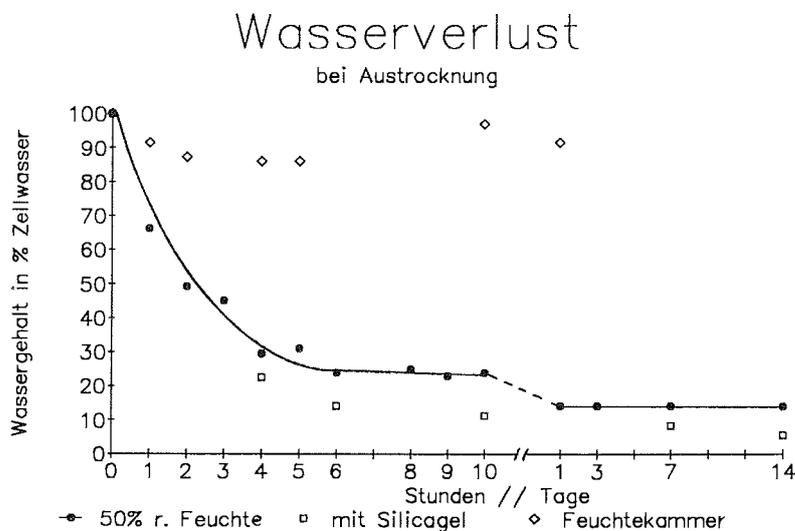
3.2. Versuche zur Austrocknung

3.2.1. Physiologie

3.2.1.1. Austrocknung der Thalli

Thalli, die trockengetupft und bei ca. 50% relativer Luftfeuchtigkeit gelagert wurden, verloren innerhalb von 6 Stunden ca. 50% ihres Frischgewichtes; dies entsprach einem Verlust von 70% des Zellwassers (Grafik 21). In der Trocknungsphase zwischen 6 und 10 Stunden ging die Austrocknungs-Geschwindigkeit deutlich zurück, danach wurde dann nur noch eine geringe Wassermenge abgegeben. Nach 1-tägiger Trocknungsdauer war der Wassergehalt auf 14% der Ausgangsmenge zurückgegangen (Wasserverlust = 86% des Zellwassers), das Trocknungsgewicht (T_g) betrug jetzt nur noch 39% des ursprünglichen Frischgewichtes. In den folgenden 13 Tagen blieb das Trocknungsgewicht konstant, d.h. es wurde kein Wasser mehr abgegeben. Die Größe der getrockneten Thalli hatte keinen erkennbaren Einfluß auf diese Austrocknungs-Geschwindigkeit.

(Anmerkung: Das absolute Gewebe-Trockengewicht (Tr) der Thalli betrug 29% des Frischgewichtes, vgl. 3.1.2.2. und Grafik 3)

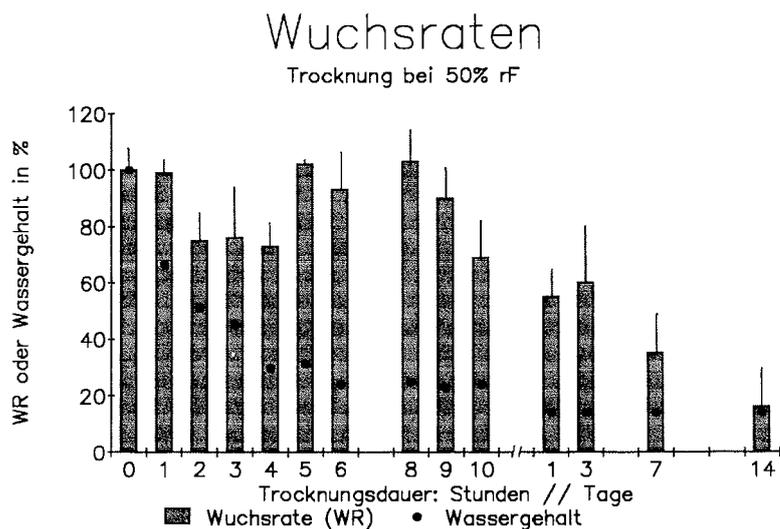


Grafik 21: Abnahme des Zellwasser-Gehaltes bei der Trocknung in 50% rel. Luftfeuchtigkeit, in der Feuchtekammer und über Silicagel

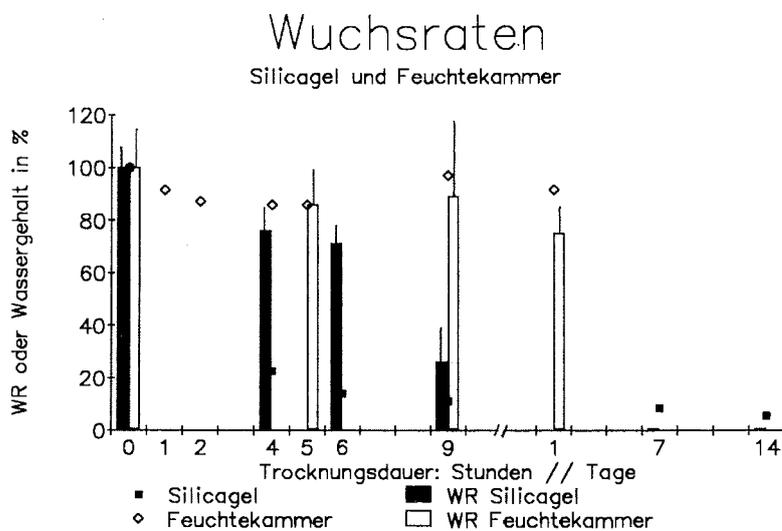
Die relative Luftfeuchtigkeit der Umgebung beeinflusste die Austrocknung der Algen. So konnte nur durch Trocknung über Silicagel den Thalli mehr als 86% ihres Zellwassers entzogen werden, der Wasserverlust betrug hier nach 10-stündiger Trocknung 89%, innerhalb von 14 Tagen verloren Thalli maximal 94% ihres Zellwassers. Die Lagerung in einem Gefäß mit hoher Luftfeuchtigkeit dagegen führte erwartungsgemäß zu sehr geringen Wasserverlusten. Hier blieb auch bei längerer Lagerung der Wasserverlust unter 15% des Zellwassers; in einigen Fällen wurde vermutlich auch Feuchtigkeit aus der Luft wieder aufgenommen (Grafik 21).

3.2.1.2. Wuchsraten

Für die Wuchsraten (WR) nach Rückführung in PES-Medium war nicht nur der vorherige Wasserverlust, sondern auch die Trocknungsdauer von Bedeutung (Grafik 22 - 24). Nach Trocknung bei 50% relativer Luftfeuchtigkeit nahm die WR mit verlängerter Trocknungsdauer ab. Allerdings gab es eine Phase zwischen 5 und 9 Stunden Trocknungsdauer, in der die WR wieder anstieg und sogar 100% erreichte (Grafik 22). In dieser Phase blieb der Wassergehalt mit ca. 24% des Zellwassers während der Lagerung relativ stabil. Er war somit nicht allein Ursache für die unterschiedlichen Wuchsraten. Eine mehrtägige Austrocknung reduzierte die WR deutlich, obwohl nach dem ersten Tag kein weiterer Wasserverlust eingetreten war. Nach 3 Monaten Lagerung bei 50% relativer Luftfeuchtigkeit entfärbten sich die Thalli wenige Tage nach der Wiederbenetzung und zeigten kein Wachstum mehr, obwohl der Wassergehalt während der Trocknung nicht unter 14% des Zellwassers gesunken war.



Grafik 22: Wuchsraten nach Austrocknung bei 50% rel. Luftfeuchtigkeit. Der vorausgegangene Wasserverlust ist zum Vergleich eingezeichnet



Grafik 23: Wuchsraten nach Trocknung über Silicagel oder in der Feuchtekammer, die entsprechenden Wasserverluste sind markiert

3.2.1.3. Photosynthese und Atmung während der Austrocknung

Innerhalb der ersten 6 Stunden nach dem Trockentupfen der Alge und anschließender Lagerung bei 50% relativer Luftfeuchtigkeit waren Photosynthese und Atmung noch nachweisbar. Die Raten lagen vermutlich erheblich unter den Raten in PES-Medium, genauere Aussagen sind aufgrund der ungenauen Methode nicht möglich (vgl. 2.2.15.). Es wurde beobachtet, daß Photosynthese oder Atmung in dem o.g. Zeitraum nur dann nachweisbar waren, wenn die Zellen noch mindestens 30% des Zellwassers enthielten.

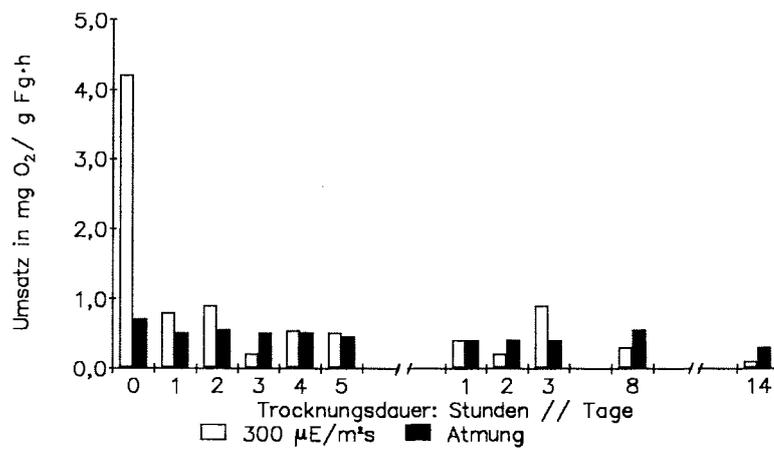
3.2.1.4. Photosynthese und Atmung nach Wiederbenetzung

Die Photosyntheseraten wurden durch die vorherige Austrocknung (bei 50% relativer Luftfeuchtigkeit) stark erniedrigt. Die Austrocknungs-dauer hatte dabei kaum einen Einfluß auf die Photosynthese unmittelbar nach der Wiederbenetzung (Grafik 25). Längere Wiederbenetzung (3 Stunden bis 3 Tage) führte zu einer deutlichen Erholung der Photosyntheseraten. Diese erreichten dann fast wieder die Normalwerte, auch wenn die Thalli viele Tage trocken gelegen hatten.

Die Atmungsraten wurden durch die Austrocknung weniger beeinträchtigt, sie lagen schon unmittelbar nach der Rückführung in PES-Medium im Bereich der Normalrate (Grafik 25). Die längerfristige Wiederbenetzung führte daher zu keiner wesentlichen Steigerung der Atmungsraten.

In der Normalkultur (ohne Austrocknung) übertraf die Photosyntheserate die Atmungsrate (Dunkelatmung) um das 5-fache (0-Wert in Grafik 25). Nach der Austrocknung lagen Photosynthese- und Atmungsraten dicht beieinander, d.h. es gab häufig keine, oder nur eine geringe Netto-Photosynthese.

Photosynthese und Atmung gleich nach der Wiederbenetzung



Grafik 25: Photosynthese und Atmung nach der Wiederbenetzung, in Abhängigkeit von der vorausgegangenen Austrocknungsdauer.

3.2.2. Ultrastruktur nach Austrocknung

Die Ultrastruktur der Zellen von *P. crista* (vgl. 3.1.3.1.) wurde durch die Austrocknung der Thalli offenbar nur wenig beeinflusst.

Das Cytoplasma und das Chloroplasten-Stroma waren oft sehr inhomogen; dies war aber möglicherweise durch eine mangelhafte Präparation bedingt. Die unfixierten Nanoplast-Einbettungen wiesen besonders bei den stärker getrockneten Proben sehr große Löcher auf. Die Analyse der Ultrastruktur konnte daher nur an kleinen Teilbereichen des Thallus durchgeführt werden.

Nach 4-stündiger Trocknung waren die lipophilen Globuli im Cytoplasma gelegentlich zu großen Tropfen vereinigt (Abb. 33). Mit fortschreitender Austrocknung waren diese Tropfen häufiger zu erkennen (Abb. 34 + 39), sie konnten vor allem nach Spurr-Einbettung gut dargestellt werden. Das Gesamtvolumen der Globuli war in getrockneten Thalli vermutlich nicht größer als in den Kontrollen; allerdings wurde eine quantitative Analyse nicht durchgeführt.

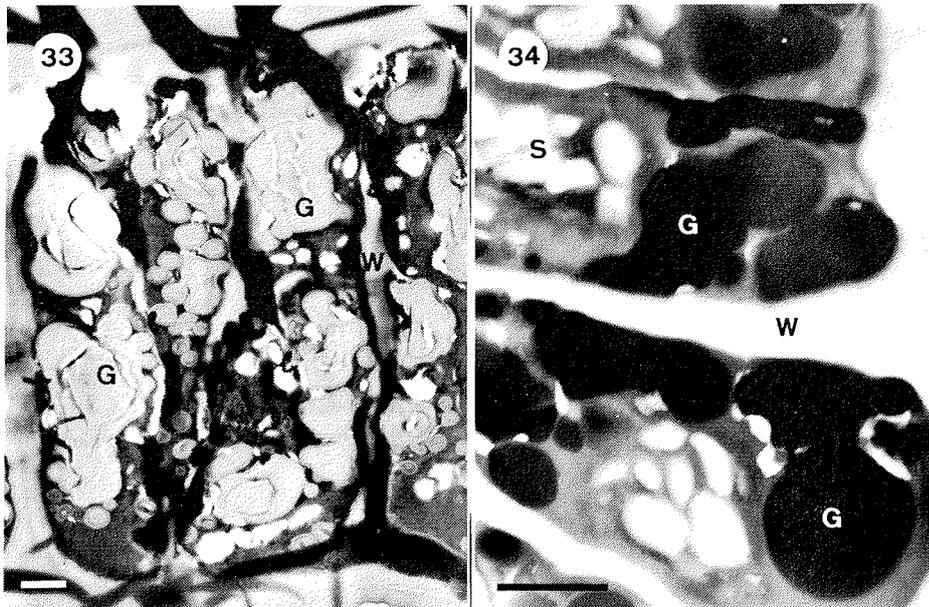


Abb. 33 + 34: Veränderungen in den Globuli nach Austrocknung

33: 4 Stunden Austrocknung (nachkontrastiertes Präparat)

34: 1 Tag Austrocknung (Präparat nicht nachkontrastiert)

G = Globuli, S = Stärke, W = Zellwand

Die Membranen, insbesondere die Thylakoide, wurden durch die Trocknung offenbar nicht beschädigt. Nach 1-tägiger Trocknung (Abb. 35 + 36) waren sie in den Nanoplast-Präparaten besonders gut zu erkennen. Auch nach 7-tägiger Trocknung (Abb. 37) oder 14-tägiger Trocknung (Abb. 40) erschienen die Membranen des Chloroplasten unverändert gegenüber den Kontrollen. Die Membranen von Mitochondrien und Zellkernen (Abb. 36 + 38) wurden durch die Trocknung ebenfalls nicht zerstört; die Form der Zellkerne war aber meist nicht so rund wie in den ungetrockneten Proben.

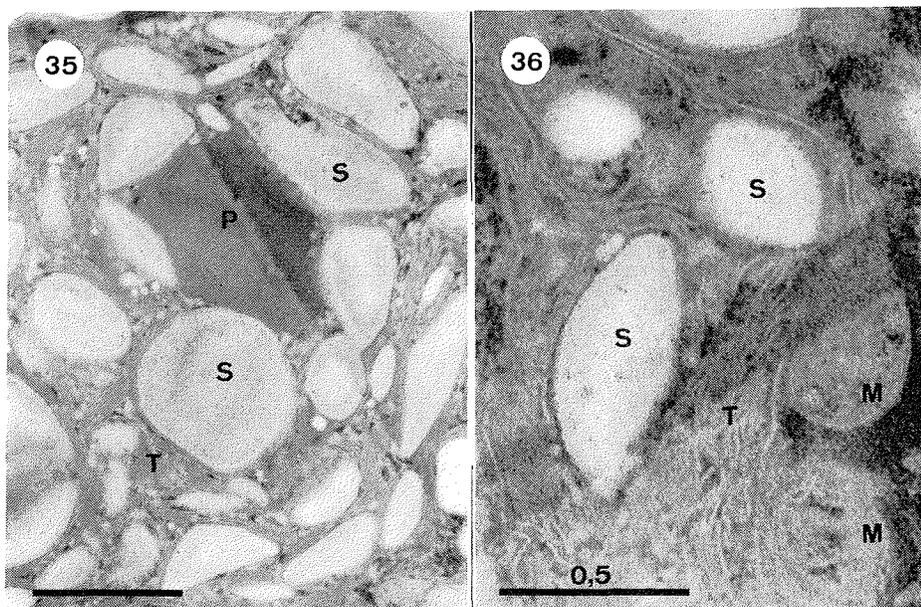


Abb. 35 + 36: Einfluß der Trocknung auf die Membranen

35: Chloroplast, (Thallus 1 Tag getrocknet)

36: Thylakoide und Mitochondrien nach 1-tägiger Trocknung
M = Mitochondrium, P = Pyrenoid, S = Stärke, T = Thylakoide

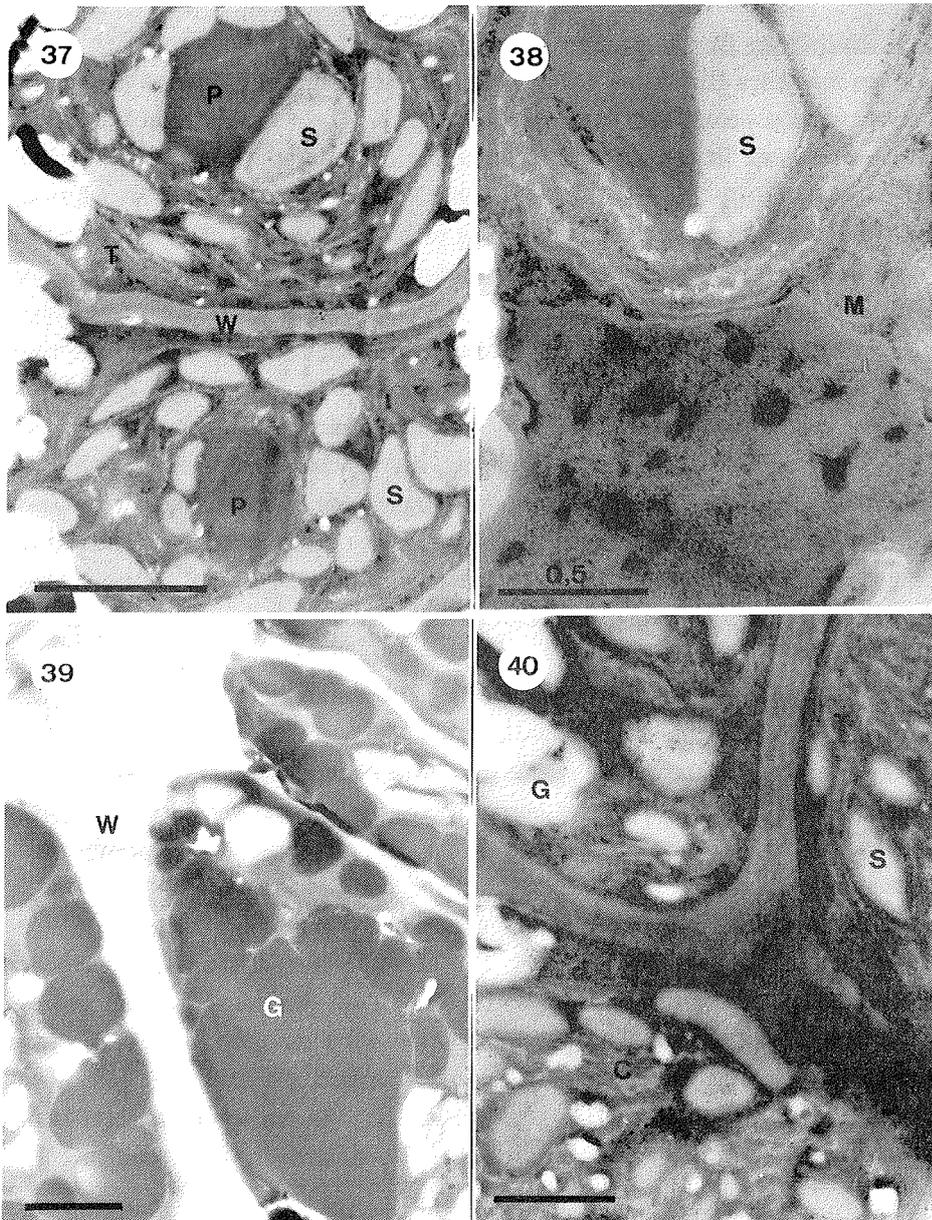


Abb. 37 - 40: Einfluß langfristiger Trocknung bei 50 % rel. Luftfeuchte

37: Chloroplasten nach 7 Tagen Trocknung

38: Zellkern nach 7 Tagen Trocknung

39: Globuli nach 7 Tagen Trocknung

40: Zellen nach 14 Tagen Trocknung

C = Chloroplast, G = Globuli, M = Mitochondrium, N = Nucleus,
P = Pyrenoid, S = Stärke, T = Thylakoide, W = Zellwand

3.3. Einfluß der Bleikontrastierung auf die Globuli

An den lipophilen Globuli im Cytoplasma wurde ein seltenes Phänomen beobachtet: die Nachkontrastierung mit Bleicitrat (Abb. 41 + 42) führte zu einer Aufhellung (Kontrastverlust). In der Standard-Literatur zur elektronenmikroskopischen Technik (z.B. PLATTNER & ZINGSHEIM, 1987 oder KNIGHT, 1977) wird ein Kontrastverlust durch die Bleikontrastierung nach REYNOLDS (1963) als sehr selten beschrieben und im allgemeinen auf den Verlust organischen Materials nach längerer Einwirkzeit zurückgeführt (CATTINI & DAVIS, 1983). Es erschien interessant, dieses Phänomen an den Globuli von *P. crista* näher zu untersuchen. Die Ergebnisse werden hier nur kurz beschrieben und diskutiert, da sie für die eigentlichen Fragestellungen dieser Arbeit von untergeordneter Bedeutung sind.

Um sicherzugehen, daß die Aufhellung der Globuli nicht nur durch den Kontrastgewinn der umgebenden Strukturen vorgetäuscht wurde, diente der Grauwert des Einbettungsmittels als Vergleich. Da die daraus resultierenden Aufnahmen oft sehr dunkel waren, werden hier zur Darstellung der Ergebnisse hellere Abzüge gezeigt. Alle Versuche wurden an Serienschnitten durchgeführt.

Der Kontrastverlust wurde durch die Bleicitratlösung allein verursacht (Abb. 41 + 42), aber die Vorbehandlung mit Uranylacetat (vgl. 2.3.9.) verstärkte den Effekt. Zum Kontrastverlust reichte eine Behandlungsdauer von 10 Sekunden aus, längere Behandlung führte nur zur unspezifischen Anlagerung von Blei im gesamten Präparat. Versuche mit Ersatzlösungen, die die pH-Werte der Kontrastierungs-lösungen simulierten, zeigten keine Aufhellung der Globuli (Abb. 43 + 44). Der Kontrastverlust des Präparates wurde also nicht durch die extremen pH-Werte (Uranylacetat: pH 4; Bleicitrat: pH 12) hervorgerufen. Nach Behandlung mit komplexbildenden Substanzen wie EDTA (Abb. 46) war nur ein sehr geringer Aufhellungseffekt gegenüber der Kontrolle (Abb. 45) feststellbar, dasselbe Ergebnis zeigte die "bleifreie Bleilösung" (Abb. 47). Wurden die Präparate jedoch mit reduzierenden Substanzen wie H_2O_2 behandelt (Abb. 48), trat schon nach sehr kurzer Einwirkzeit (10 Sekunden) ein fast vollständiger Kontrastverlust der Globuli ein.

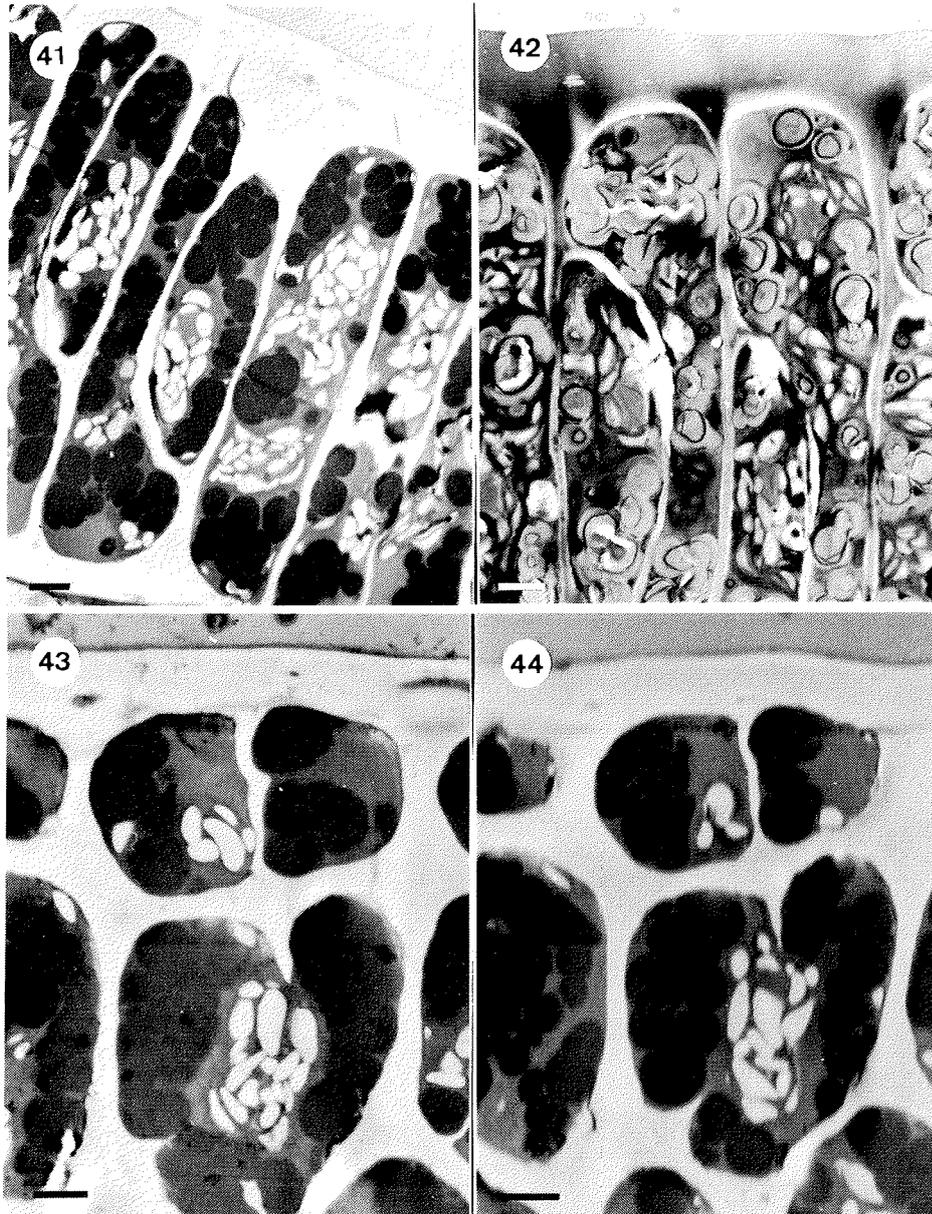


Abb. 41 - 44: Kontrastverlust der Globuli (1)

- 41: unbehandelte Kontrolle
- 42: Kontrastierung nur mit Bleicitrat (3 Minuten)
- 43: unbehandelte Kontrolle zu Abb.44
- 44: Simulation der Bleicitrat-Lösung (pH 12; 10 Minuten)

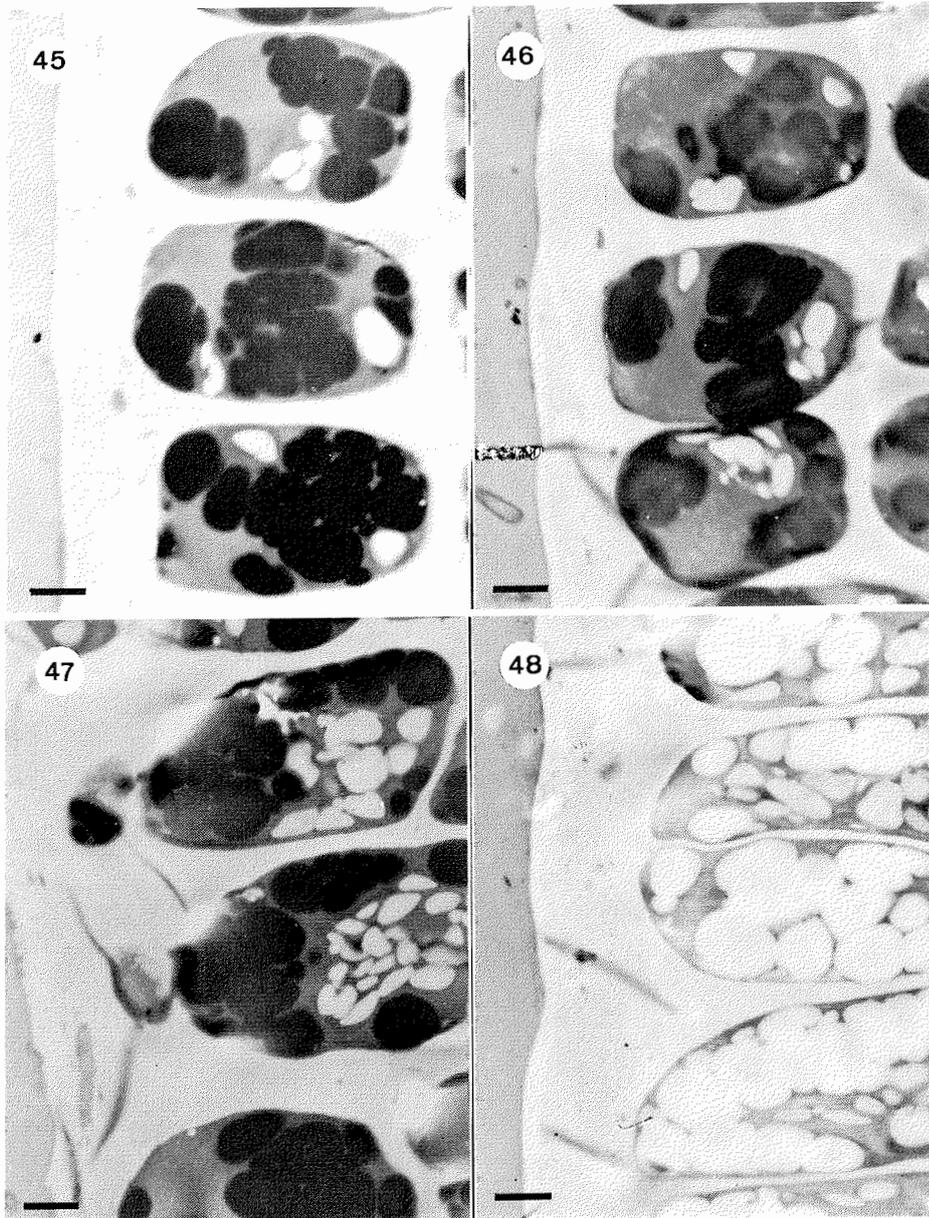


Abb. 45 - 48: Kontrastverlust der Globuli (2)

- 45: unbehandelte Kontrolle
- 46: Behandlung mit EDTA-Lösung (Komplexbildung)
- 47: Behandlung mit "bleifreier Bleilösung"
- 48: Behandlung mit H_2O_2 (7,5%; 10 Sekunden)

Andere kontrastreiche Strukturen im Protoplasma waren vom Kontrastverlust nicht betroffen. Es gab jedoch Inkrusten in der Zellwand, die den gleichen Kontrastverlust wie die Globuli zeigten. Wenn die Globuli ihren Kontrast verloren hatten, konnten sie auch durch eine erneute Behandlung mit Osmium nicht wieder kontrastiert werden.

Die Auswertung der Versuche ergab, daß das Osmium durch das Blei-Ion aus den Globuli herausgelöst wurde. Die Uranylbehandlung verstärkte den Effekt, weil Uranyl als "Verbindungsstück" die Anlagerung von Blei an Osmium erleichtert (PLATTNER & ZINGSHEIM, 1987). Da pH-Änderungen allein keine Wirkung zeigten, ist ein Einfluß auf die Ladungsverhältnisse an den polaren Gruppen des Präparates unwahrscheinlich. Der Verlust organischen Materials läßt sich wegen der kurzen Einwirkzeiten und der fehlenden Wirkung der pH-Lösungen ausschließen, ein organischer Materialverlust durch die Wirkung des Blei-Ions ebenfalls. Die geringe Wirkung von komplexbildenden Substanzen läßt vermuten, daß das Osmium nur vom Blei-Ion gebunden und dadurch aus dem Präparat herausgelöst wird. Osmium lagert sich bevorzugt an ungesättigte Bindungen im Präparat, der starke ursprüngliche Kontrast deutet auf eine große Anzahl solcher Doppelbindungen in den Globuli hin. Die Globuli waren nicht re-osmierbar, weil alle Doppelbindungen bei der ersten Osmium-Behandlung abgesättigt worden waren.

Als Schlußfolgerung kann daher vermutet werden, daß die Globuli aus einer lipophilen Substanz bestehen, die reich an ungesättigten Verbindungen ist.

4. Diskussion

4.1. Versuche mit unterschiedlichen Salinitäten

4.1.1. Physiologie

4.1.1.1. Wuchsraten

Die nahezu konstanten Wuchsraten von *P. crista* in Salinitäten zwischen 0,35‰ und 35‰ belegen, daß diese Art ausgezeichnet an hypoosmotische Bedingungen angepasst ist. Die nahe verwandte Art *Prasiola stipitata* toleriert ebenfalls stark hypoosmotische Bedingungen (RUSSELL, pers. Mitteilung). Bei *Porphyra umbilicalis*, einer Rotalge des oberen Eulitorals, führten jedoch hypoosmotische Bedingungen (unter 7‰) zum Absterben der Thalli (WIENCKE & LÄUCHLI, 1980). Auch viele einzellige Meeresalgen sterben in Salinitäten unter 5‰ schnell ab (McLACHLAN, 1961), dies ist sicherlich bei einigen Arten auf fehlende Zellwände zurückzuführen. Die gute Anpassung an hyposaline Bedingungen unterscheidet also die beiden *Prasiola*-Arten von anderen Meeresalgen. Da es in der Gattung *Prasiola* auch Süßwasserarten gibt (z.B. *P. calophylla*; BROADY, 1989a+b), könnte man die Anpassung von *P. crista* an hyposaline Standorte durch die Abstammung von Süßwasserarten erklären.

Wie auch bei *Porphyra* (WIENCKE & LÄUCHLI, 1980) nahm das Wachstum von *P. crista* in Salinitäten über 35‰ sehr schnell ab, beide Arten ertrugen aber Salinitäten bis zu 175‰. Bei *P. crista* war sogar noch eine geringe Zunahme der organischen Trockensubstanz zu beobachten. Außerdem belegen die Wuchsraten von *P. crista* in der Nachkultur, daß keine irreversible Schädigung des Thallus eingetreten war.

Die gute Anpassung an hyposaline Bedingungen und die Toleranz gegenüber hohen Salinitäten machen *P. crista* zu einer euryhalinen Art. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für Algen, die in Habitaten mit hohen Salinitätsschwankungen leben (KIRST, 1990).

4.1.1.2. Photosynthese und Atmung

Hypoosmotische Belastung verursachte bei Mikroalgen mit Zellwand keine Inhibition von Photosynthese und Atmung (HELLEBUST, 1985). Da auch *P. crista* durch eine starke Zellwand vor übermäßiger Volumenzunahme geschützt ist, wurden Photosynthese und Atmung hier ebenfalls nicht beeinträchtigt. Die reduzierten Photosyntheseleistungen nach der Rückführung von 175‰ in 35‰ (Grafik 15) waren keine Folge des Downshocks, sondern ein Effekt der vorausgegangenen 14-tägigen

hyperosmotischen Belastung. Das spontane Wiedereinsetzen von Photosynthese und Atmung unmittelbar nach dem Downshock zeigt deutlich, daß diese Salinitätsänderung einen positiven Einfluß auf die Zellen hatte (Beendigung des hyperosmotischen Stresses). Die Atmung erholte sich deutlich schneller als die Photosynthese. Sie wurde möglicherweise durch den Downshock stimuliert wie auch bei *Tetraselmis (Platymonas) subcordiformis* beobachtet (KIRST & KELLER, 1976). Bei der Rotalge *Bangia atropurpurea*, die wie *P. crispata* im Supralitoral vorkommt, wurde die Photosyntheserate auch in stark hyposalinen Medien deutlich gesteigert (REED, 1985). Dies zeigt, daß gute Photosyntheseleistungen unter hypoosmotischen Bedingungen eine wichtige Anpassung an das Leben im Supralitoral sind. *Ulva lactuca*, eine Art des Eulitorals, zeigte dagegen unter stark hypoosmotischen Bedingungen eine deutliche Verminderung der Photosyntheseleistung (GESSNER & HAMMER, 1960).

Leichte osmotische Upshocks führen häufig zu einer Steigerung der Atmungsrate ("Streßatmung"), beobachtet an *Cladophora rupestris* (WIENCKE & DAVENPORT, 1987) oder an *Tetraselmis (Platymonas) subcordiformis* (KIRST & KELLER, 1976). Bei der Rotalge *Griffithsia monilis* wurde sogar eine Steigerung der Photosynthese gemessen (KIRST, 1981). Dagegen führen starke Upshocks immer zu einer deutlichen Inhibition von Photosynthese und Atmung (KIRST, 1977b; 1990), dies war auch bei *P. crispata* der Fall. Die Reduktion der Photosynthese ist offenbar auf Beeinträchtigungen im Elektronen-transport zurückzuführen. SATOH et al. (1983) konnten an *Porphyra perforata* zeigen, daß durch den Salzstreß der Elektronentransport an den Photosystemen mehrfach gestört war. Dies gilt auch für marine Makroalgen unter Trockenstreß (WILTENS et al., 1978). Da beim Austrocknen die zellinterne Ionenkonzentration steigt, sind die Auswirkungen von Trockenheit und Salzstreß auf die Photosynthese vergleichbar (KIRST, 1990).

Im Gegensatz zu den Photosyntheseraten wurden der Lichtkompensationspunkt und der Bereich der Lichtsättigung durch die unterschiedlichen Salinitäten nicht verändert. Dies stimmt mit den Daten für die sublitorale Rotalge *Griffithsia monilis* überein (KIRST, 1981). Da *Griffithsia* und *P. crispata* erhebliche Unterschiede im Photosynthese-apparat und in den Lichtbedürfnissen haben, kann man vermuten, daß Lichtsättigung und Lichtkompensationspunkt möglicherweise generell nicht durch unterschiedliche Salinitäten beeinflusst werden.

Die Photosynthese- und Atmungsraten von *P. crista* stimmten mit den entsprechenden Wuchsraten gut überein. Photosynthese und Atmung waren nach dem Upshock stark reduziert und nach 14 Tagen in 175‰ nicht mehr nachweisbar. Offenbar reichte die Energieversorgung der Zellen für die Synthese von organischen Osmotika und Chlorophyll trotzdem noch aus.

4.1.1.3. Wassergehalt und Chlorophyllgehalt

Die Bezugsgröße Frischgewicht wurde durch unterschiedliche Wassergehalte der Thalli (vgl. Grafik 3) beeinflusst. In einigen Fällen erschien es daher notwendig, das organische Trockengewicht als vergleichende Bezugsgröße heranzuziehen. So konnte gezeigt werden, daß die negativen Wuchsraten in der 175‰-Kultur auf den Wasserverlust der Thalli zurückzuführen waren. Die Konzentrationsangaben der analysierten Inhaltsstoffe hingen ebenfalls vom Wassergehalt der Thalli ab. Allerdings blieben die Verhältnisse zwischen den einzelnen Versuchsgliedern (Salinitäten) durch die Bezugsgröße relativ unverändert. So ist beispielsweise mit beiden Bezugsgrößen ein Ansteigen der Chlorophyll-Konzentrationen bei hohen Salinitäten (70‰ und 175‰) nachweisbar. Bei *P. crista* war die Chlorophyllsynthese im Bereich des Wachstumsoptimums (17‰) am produktivsten. In den hohen Salinitäten wurde aber wegen der reduzierten Wuchsraten mehr Chlorophyll angereichert.

In vielen einzelligen marinen Algen wurde eine Abhängigkeit des Chlorophyllgehaltes von der Salinität nachgewiesen (McLACHLAN, 1961). Die meisten Arten hatten jedoch den höchsten Chlorophyll-Gehalt in Salzkonzentrationen unter 35‰ (KIRST, 1975b), bei vielen Arten ist dies zugleich die Salinität des optimalen Wachstums (McLACHLAN, 1961). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß diese Daten von Mikroalgen stammen, die nur bedingt mit *P. crista* zu vergleichen sind.

4.1.1.4. Ionen und organische Osmotika

Kationen:

Die gefundenen K⁺-Konzentrationen lagen in allen Proben ungefähr doppelt so hoch wie die Na⁺-Gehalte. Im Gegensatz dazu betrug die Relation von K⁺ zu Na⁺ in allen Kulturmedien ca. 1:50 und änderte sich durch die unterschiedlichen Salinitäten kaum. K⁺ wurde also sehr bevorzugt aufgenommen. Im Gegensatz zu Na⁺ ist K⁺ auch in hohen Konzentrationen nicht toxisch für das Cytoplasma; K⁺ wurde deswegen von BROWN (1976) zu den "compatible solutes" gezählt. Diese Bevorzugung von K⁺ gegenüber Na⁺ ist ein Merkmal vieler cytoplasmareicher Mikroalgen (KIRST, 1977b + c), wurde aber auch bei thallösen Makroalgen wie *Porphyra umbilicalis* (WIENCKE & LÄUCHLI, 1981) oder *Enteromorpha prolifera* (YOUNG et al.,

1987a) beschrieben. Bei *P. crisper* lagen die intrazellulären K^+ -Konzentrationen weit über denen des Mediums. Auch bei verschiedenen *Dunaliella*-Species, die extrem hohe NaCl-Konzentrationen ertragen können, wurde regelmäßig eine Anreicherung von K^+ über die Konzentration des Kulturmediums hinaus beobachtet (GINZBURG, 1987).

Die starke Anreicherung von K^+ im ECS gegenüber den Kulturmedien hat die bevorzugte K^+ -Aufnahme sicherlich unterstützt. Die Zellwand von *P. crisper* besteht gerade in den inneren Bereichen überwiegend aus Pektinen (vgl. 3.1.3.1.). Dadurch besitzen die Zellwände in diesen Bereichen eine hohe Anzahl fixierter negativer Ladungen. K^+ -Ionen können gut an diese Ladungen binden. Sie sind (mit Hydrathülle) kleiner als Na^+ -Ionen und dadurch mobiler. Außerdem werden sie wegen der höheren Ladungsdichte an der Oberfläche der Hydrathülle besser gebunden als hydratisierte Na^+ -Ionen. Da die Na^+ -Konzentration in fast allen Salinitäten im ECS und im Medium gleich war, hat hier offenbar keine Adsorption durch die Zellwand stattgefunden. Nur in der 0,35‰-Kultur war eine leichte Anreicherung von Na^+ gegenüber dem Kulturmedium feststellbar. Da aber in dieser Kultur die K^+ -Konzentration im ECS höher war als die Na^+ -Konzentration (trotz des oben beschriebenen Konzentrations-Unterschiedes im Medium), wird die bevorzugte Adsorption von K^+ besonders deutlich.

In der 70‰-Kultur wurde im ECS kein auswaschbares K^+ mehr nachgewiesen. Eine Entleerung des ECS von K^+ ist jedoch nur schwer vorstellbar. Sowohl das große Volumen des ECS (ca. 50% des Thallus) als auch seine Fähigkeit, K^+ gegenüber dem Kulturmedium anzureichern (vgl. Grafik 8), sprechen gegen eine vollständige Entfernung des K^+ aus dem ECS infolge gesteigerter K^+ -Aufnahme durch den Protoplasten. Die relativ hohen Standardabweichungen der Mittelwerte in diesem Versuch (vgl. Grafik 4) zeigen, daß der Austausch des K^+ durch die Waschlösungen teilweise unvollständig ist. Ähnliche Probleme ergab der Na^+ -Austausch in der Zellwand von *Ulva lactuca* (RITCHIE, 1988). Auch bei der Grünalge *Enteromorpha intestinalis*, die ebenso wie *Ulva lactuca* und *P. crisper* über sehr dicke Zellwände verfügt, werden bevorzugt Kationen im ECS angereichert. Dabei können Austauschkapazitäten von 2,5 mmol / g Tr erreicht werden (RITCHIE & LARKUM, 1982a+b).

Die starke Ausprägung der Zellwand und ihre Bedeutung für die Osmotoleranz ist nicht nur bei den oben genannten Grünalgen gegeben, sondern auch an der Rotalge *Porphyra* nachgewiesen worden und daher vermutlich eine Anpassung an das Habitat bei euryhalinen Algen (RITCHIE, 1988).

In der 175‰-Kultur waren die K⁺-Konzentrationen von *P. crisper* geringer als in 70‰. So etwas wurde auch bei *Enteromorpha prolifera* beobachtet (YOUNG et al., 1987a). Hier wurde, wegen des gleichzeitigen Anstiegs der Na⁺-Konzentrationen, eine Schädigung des Plasmalemmas dafür verantwortlich gemacht. Das Plasmalemma war aber bei *P. crisper* sicher nicht geschädigt, denn der Na⁺-Gehalt war in der 175‰-Kultur niedriger als in der 70‰-Kultur, und das intrazelluläre Verhältnis von K⁺ : Na⁺ blieb mit ca. 2 : 1 in allen Salinitäten konstant.

Die intrazelluläre Na⁺-Konzentration von *P. crisper* lag nur in der 0,35‰-Kultur im Bereich der Außenkonzentration. In allen anderen Kulturen lagen die Na⁺-Gehalte des Protoplasten weit unter denen der Medien. Obwohl die Na⁺-Konzentration in den Zellen mit wachsender Salinität um den Faktor 10 anstieg, wurde von *P. crisper* weniger Na⁺ als K⁺ aufgenommen, dies ist charakteristisch für cytoplasmareiche Arten. Bei vielen anderen Makroalgen überwiegt dagegen das Vakuolenvolumen, dort kann auch Na⁺ in größeren Mengen angereichert werden. Durch die Kompartimentierung des Na⁺ in der Vakuole wird der übrige Protoplast vor dem toxischen Einfluß des Na⁺ geschützt (WIENCKE et al., 1983). Es ist allerdings bisher kein Zusammenhang zwischen der Thallusmorphologie und der Auswahl der angereicherten Ionen (K⁺ oder Na⁺) bekannt (KIRST & BISSON, 1979).

Sowohl K⁺ als auch Na⁺ zeigten die höchste intrazelluläre Konzentration nicht in der höchsten Salinitätsstufe, sondern in der 70‰-Kultur. Auf dieses Phänomen wird bei der Diskussion der osmotischen Potentiale (vgl. 4.1.1.5.) näher eingegangen.

Die benutzten Kulturmedien enthielten kein NH₄⁺; dennoch wurde in den Zellen eine Anreicherung von NH₄⁺ gemessen. Da unter Salzstreß die Proteinsynthese gestört sein kann (LIU & HELLEBUST, 1976a+b) wurde hier möglicherweise bereits zu NH₄⁺ reduziertes NO₃⁻ nicht verbraucht. Andererseits kann NH₄⁺ auch aus dem Aminosäure-Stoffwechsel freigesetzt worden sein. Besonders Prolin unterliegt bei Salzstreß einem regen Metabolismus (SCHOBERT, 1980). Das NH₄⁺ in den salzbelasteten Zellen von *P. crisper* könnte also aus dem Prolin-Abbau stammen. Dafür spricht auch, daß die Konzentrationen von Prolin und NH₄⁺ ungefähr spiegelbildlich verlaufen.

Eine andere Quelle für das NH₄⁺ könnte die Umwandlung von NO₃⁻ in NH₄⁺ durch Bakterien sein, denn in allen Kulturen hafteten Bakterien an den Thalli (vgl. Abb. 11). Jedoch war dieser Bewuchs in der 175‰-Kultur, der Kultur mit den höchsten NH₄⁺-Konzentrationen, am geringsten. Da außerdem in den Kulturmedien kein NH₄⁺ nachgewiesen werden konnte, ist diese Entstehungsmöglichkeit

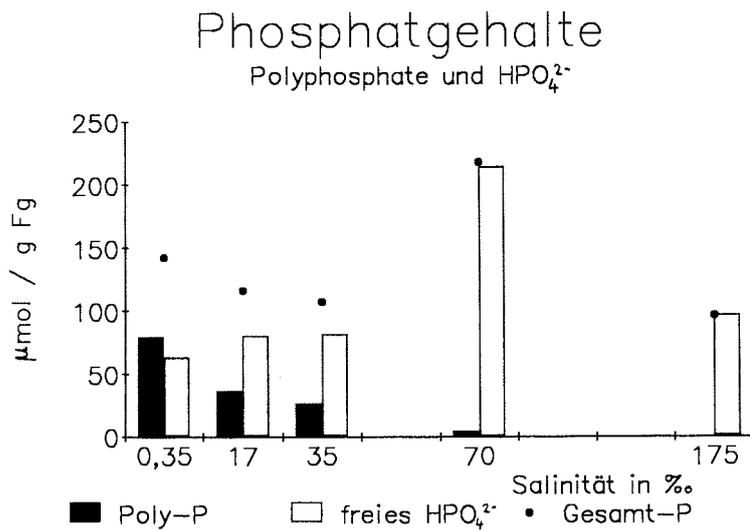
unwahrscheinlich. Am natürlichen Standort von *P. crista* in der Antarktis ist allerdings mit einem großen Angebot von NH_4^+ zu rechnen. Die Alge wächst dort häufig auf Pinguin-Bänken (BROADY, 1989b), die reich an NH_4^+ sind (LINDEBOOM, 1979). Ein Vorteil der NH_4^+ -Anreicherung besteht darin, daß die Schädigung anderer Ionen durch NH_4^+ gemindert werden kann (YANCEY et al., 1982).

Keine Veränderungen zeigten die Gehalte der zweiwertigen Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} , obwohl auch diese Ionen in den unterschiedlichen Kulturmedien um den Faktor 500 verändert wurden. Dies ist eine allgemeine Beobachtung bei Algen, die unter verschiedenen Salinitäten kultiviert wurden (KIRST, 1977b; 1990). Da beide Ionen wegen ihrer hohen Ladungsdichte eine sehr große Hydrathülle haben, sind sie weniger mobil als die einwertigen Ionen. Mg^{2+} ist ein wichtiger Cofaktor für viele Enzyme (RICHTER, 1988); eine starke Anreicherung im Cytoplasma könnte daher zu Komplikationen führen. Ca^{2+} ist wegen seiner entquellenden Wirkung auf die Plasmaproteine (RICHTER, 1988) schädlich, wenn es in höheren Konzentrationen in die Zelle gelangt. Damit haben Mg^{2+} und besonders Ca^{2+} einen schädlichen Einfluß auf die Enzyme im Cytoplasma (BOROWITZKA, 1981). Allerdings ist bekannt, daß Ca^{2+} , möglicherweise als Messenger-Substanz, die Turgorregulation beeinflussen kann (KAUSS, 1987; OKAZAKI et al., 1987a).

Anionen:

Das häufigste Anion in den Zellen von *P. crista* war HPO_4^{2-} (vgl. 3.1.2.3.). Die Anreicherung von HPO_4^{2-} unter Salzstreß wurde bisher noch nicht beschrieben. Das nachgewiesene HPO_4^{2-} kann aus zwei Quellen stammen: Zum einen enthielten alle Medien ca. 80 μM Phosphat, welches von Pflanzenzellen leicht aufgenommen werden kann; zum anderen könnte das HPO_4^{2-} aus dem Abbau interner Polyphosphate stammen. Es ist recht wahrscheinlich, daß die Zellen solche Polyphosphate als Reservestoffe speichern. Dafür spricht auch ihre Fähigkeit, 1 Jahr ohne Licht, d.h. ohne Photosynthese, überdauern zu können (eigene Beobachtung).

Die als PO_4^{3-} gemessenen Phosphatgehalte sind sicher insofern mit einem Fehler behaftet, als bei Extraktion und Analyse unvermeidlich zumindest Teile der Polyphosphate mit aufgeschlossen und gemessen wurden. Geht man nun davon aus, daß die angereicherten Kationen und Anionen mit ungefähr ausgeglichenen Ladungen vorliegen, so ergibt sich, daß nur ein Teil des gemessenen Phosphates als freies HPO_4^{2-} vorgelegen hätte. Der Rest wäre Polyphosphat, das nur durch die Extraktion und Analyse freigesetzt wurde. Die unter dieser Voraussetzung berechneten Anteile



Grafik 26: Vermutete Zusammensetzung der gemessenen Phosphat-Gehalte aus HPO_4^{2-} und Polyphosphaten. (siehe Text)

am Gesamtphosphat sind in Grafik 26 dargestellt. Die Konzentrationen von freiem Phosphat verliefen parallel zu den Konzentrationen der meisten anderen Ionen, sie stiegen mit erhöhter Salinität an und zeigten das charakteristische Maximum in der 70‰-Kultur (vgl. Grafik 4 + 5). Der Gehalt an Polyphosphaten war zwischen 35‰ und 17‰ relativ unverändert. In der 0,35‰-Kultur wurde offenbar HPO_4^{2-} zu Polyphosphaten umgebaut. In der 70‰-Kultur mußte noch zusätzlich Phosphat aus dem Kulturmedium aufgenommen werden, um die Kationenladungen ausgleichen zu können. Dagegen reichte in der 175‰-Kultur der Abbau der vorhandenen Polyphosphate aus, um die Ladungen der intrazellulären Kationen zu kompensieren (vgl. 4.1.1.5.). Der Gesamt-Phosphatgehalt ist deshalb unverändert gegenüber 35‰. Die hohen Standardabweichungen der Phosphat-Werte haben offenbar ihre Ursache in den verschiedenen Extraktionsmethoden. Die Werte innerhalb einer Versuchsserie (verschiedene Salinitäten, aber eine Extraktionsmethode) zeigten allerdings immer die gleichen Relationen zueinander, wie sie auch durch die Mittelwerte mehrerer Versuchsreihen (Grafik 6) dargestellt werden. Die statistische Auswertung ergab, daß die Unterschiede zwischen den Gesamt-Phosphatgehalten der 35‰-Kultur und denen der 0,35‰- oder der 70‰-Kultur hoch signifikant waren. Die Unterschiede zwischen der 35‰-Kultur und der 17‰- oder der 175‰-Kultur waren nicht signifikant.

Bei der obigen Kalkulation der Phosphat-Anteile wurde nicht berücksichtigt, daß auch organische Anionen (Proteine) einen erheblichen Beitrag zum Ladungsausgleich leisten können (KIRST, 1990). Bei der Ionenanalyse von Algenzellen wird daher häufig ein Kationen-Überschuß gemessen (KIRST, 1985). Die organischen Anionen von *P. crista* wurden nicht bestimmt; die starken Unterschiede im Phosphatgehalt lassen aber die Vermutung zu, daß die organischen Anionen für den Ladungsausgleich weniger wichtig sind. Die oben aufgestellte Hypothese zu den Phosphatgehalten und der Vergleich zwischen den einzelnen Salinitäten würden also vermutlich durch eine Beteiligung der organischen Anionen am Ladungsausgleich nicht wesentlich verändert. Dies gilt auch für den Fall, daß das Phosphat nicht als HPO_4^{2-} vorliegt (pH-Wert $\ll 7$).

Unter erhöhten Salinitäten ist normalerweise Cl^- das häufigste Anion in Algenzellen (BISSON & GUTKNECHT, 1975; KIRST & BISSON, 1979). Bei *Codium* wurde nachgewiesen, daß ein aktiver Cl^- -Transport die Turgorregulation steuert (BISSON & GUTKNECHT, 1980). Die in den Zellen von *P. crista* gefundenen Chloridwerte waren aber sehr gering, auch wenn sie zwischen $0,35\text{‰}$ und 175‰ auf das Zehnfache anstiegen. Es ist gut möglich, daß die o.g. Funktion des Cl^- bei *Codium* in *P. crista* vom Phosphat übernommen wird (vgl. 4.1.1.5.).

Bei *Porphyra umbilicalis* wurde unter höheren Salinitäten etwas SO_4^{2-} angereichert (WIENCKE & LÄUCHLI, 1981). Eine solche Anreicherung ist bei Algen aber relativ selten (KIRST, 1990). Sulphatierte Polysaccharide in den Zellwänden sind ein Kennzeichen mariner Algen. Sie haben vermutlich einen Einfluß auf deren Ionenaustauscher-Funktion (KLOAREG & QUATRANO, 1988). In *P. crista* konnten allerdings nur sehr geringe SO_4^{2-} -Mengen festgestellt werden, ihre Zellwände sind also offenbar nicht sulphatiert. Dies gilt auch für die Süßwasserart *Prasiola japonica* und ist typisch für Süßwasser-algen oder Landpflanzen (KLOAREG & QUATRANO, 1988).

Da die SO_4^{2-} -Analyse relativ schwierig ist, sind Fehler in den gemessenen Werten nicht auszuschließen. Allerdings wurde der geringe Schwefelgehalt der Zellwände durch die EELS-Technik bestätigt.

Bei *Porphyra purpurea* (REED et al., 1981) und bei *Blidingia minima* (KARSTEN & KIRST, 1989 b) wurde NO_3^- unter Salzstreß als Osmotikum angereichert. In den Zellen von *P. crista* konnte dagegen kein NO_3^- nachgewiesen werden. Da nun *P. crista* häufiger als nitrophil charakterisiert wurde (SCHOFIELD & AHMADJIAN, 1972; BROADY, 1989b) läßt sich vermuten, daß aufgenommenes NO_3^- sofort zu NH_4^+ reduziert und im Aminosäure-Stoffwechsel verbraucht wird. Die hohen Konzentrationen von Prolin, auch unter Kontrollbedingungen, sind ein Hinweis darauf. Außerdem wird die o.g. NH_4^+ -Aufnahme durch nitrophile Standorte begünstigt, bei vielen Algen ist das Angebot an NH_4^+ ein wichtiges Kriterium für die Nitrophilie (SCHOFIELD & AHMADJIAN, 1972). Die Nitrophilie von *P. crista* könnte aber auch eine verkannte "Phosphophilie" sein. Die als nitrophil bezeichneten Vogelbänke enthalten nämlich auch größere Mengen an PO_4^{3-} (LINDEBOOM, 1979), dessen wichtige Bedeutung für *P. crista* bereits diskutiert wurde. Letztendlich begünstigen sicher beide Verbindungen, NO_3^- und PO_4^{3-} , das Wachstum der Alge.

Organische Osmotika:

Unter den organischen Osmotika betraf die auffälligste Veränderung den Sorbitgehalt. Die Rolle der Polyole als protektive Osmotika wurde von BROWN (1976) mit dem Begriff "compatible solutes" charakterisiert. Sie sind in hohen Konzentrationen löslich und nicht toxisch für den Zell-Stoffwechsel (BROWN & HELLEBUST, 1978). Die OH-Gruppen der Polyole können vermutlich hydrophile Makromoleküle stabilisieren und dadurch fehlendes Wasser im Cytoplasma ersetzen (SCHOBERT, 1977). Sorbit ist als Osmotikum bei Diatomeen weit verbreitet (LIU & HELLEBUST, 1976c). Bei grünen Makroalgen wurde es bisher nur in *Prasiola stipitata* nachgewiesen (KERBY et al., 1989). Darüber hinaus wirkt Sorbit auch als Gefrierschutz-Mittel (CLOUGHLAN & HEBER, 1982), die hohen Sorbitgehalte (auch bei normaler Salinität) könnten also eine Anpassung an den antarktischen Lebensraum von *P. crista* sein.

Der kontinuierliche Anstieg des Saccharosegehaltes verlief auf einem wesentlich niedrigeren Niveau als der Sorbitgehalt. Saccharose ist ebenfalls als Osmotikum beschrieben (OKAZAKI et al., 1987b; EDWARDS et al., 1988). Allerdings können hohe Saccharosekonzentrationen die Enzymaktivitäten der Zelle stören (EDWARDS et al., 1987). Dadurch ist Saccharose als Osmotikum ungeeigneter als die oben genannten Polyole.

Die leichte Anreicherung von Glukose in der 70‰-Kultur ist ungewöhnlich, da Glukose, wegen ihrer vielfältigen Bedeutung im Stoffwechsel, schnell umgesetzt wird. Möglicherweise war die Weiterverarbeitung der Glukose bei *P. crispa* durch die Salzbelastung gestört, während die Photosynthese oder der Stärkeabbau noch geringe Glukosemengen nachlieferten.

Bei Energiemangel (Störung der Photosynthese durch Salzstreß) werden organische Osmotika oft aus Reserve-Kohlenhydraten synthetisiert (WIENCKE & LÄUCHLI, 1981; HELLEBUST & LIN, 1989; GIMMLER & MÖLLER, 1981). Bei *P. crispa* wurde unter 14-tägigem Salzstreß offenbar relativ wenig Stärke abgebaut, quantitative Abschätzungen waren nur anhand der elektronenmikroskopischen Abbildungen möglich. Das Auftreten erodierter Stärke und deren längerfristiger Abbau (vgl. 3.1.3.2.) geben aber einen Hinweis auf die Beteiligung der Reservestärke an der Synthese organischer Osmotika (vgl. 4.1.2.2.).

Die Konzentrationen an freien Aminosäuren waren unter allen Salinitäten relativ unverändert. Daher hatten sie auf die Regulation des osmotischen Potentials offenbar nur geringen Einfluß. Der Prolinanteil war sehr hoch, teilweise betrug er über 50% aller Aminosäuren. Prolin ist als organisches Osmotikum oft beschrieben worden (BROWN & HELLEBUST, 1978; EDWARDS et al., 1988; KARSTEN & KIRST, 1989a), in vielen Grünalgen stellt es einen erheblichen Anteil der freien Aminosäuren (BROWN & HELLEBUST, 1980). Prolin zählt ebenfalls zu den "compatible solutes", da es bei Wassermangel im Cytoplasma Proteine stabilisieren kann (SCHOBERT, 1977) und auch in hohen Konzentrationen nicht toxisch ist (BROWN & HELLEBUST, 1978). Prolin kann unter Salzstreß aus anderen Aminosäuren synthetisiert werden und wird bei hypoosmotischen Bedingungen schnell abgebaut (LIU & HELLEBUST, 1976a+b) oder in das Medium abgegeben (SCHOBERT, 1980). Die Beziehung zwischen Prolin- und NH_4^+ -Gehalt bei *P. crispa* wurde bereits diskutiert (vgl. oben). Die Anreicherung von Aminosäuren unter Salzstreß kann durch eine gestörte Proteinsynthese verstärkt werden (LIU & HELLEBUST, 1976b).

Dimethylsulphoniopropionat (DMSP) ist ein organisches Osmotikum, das häufig in grünen Meeressalgen (z.B. *Ulva lactuca* : DICKSON et al., 1980) zu finden ist. Es ist auch in grünen antarktischen Makroalgen weit verbreitet, war aber in *P. crispa* nicht nachweisbar (KARSTEN et al., 1990). Glycerin ist als Osmotikum bei *Dunaliella* bekannt (BROWN & BOROWITZKA, 1979; GIMMLER & MÖLLER, 1981), ist aber in *P. crispa* nicht enthalten (KARSTEN, pers. Mitteilung). In *Prasiola stipitata* wurde Ribit gefunden (KERBY et al., 1989), die Ribit-Konzentrationen in *P. crispa*

sind unbedeutend; möglicherweise enthält die Alge geringe Mengen eines weiteren, bisher nicht bestimmten Polyols (KARSTEN, pers. Mitteilung).

Insgesamt trugen die untersuchten organischen Osmotika nur verhältnismäßig wenig zum osmotischen Potential der Zellen von *P. crisper* bei. Ähnliches wurde bei *Enteromorpha intestinalis* beobachtet (EDWARDS et al., 1988), obwohl die organischen Osmotika bei plasmareichen Arten im allgemeinen einen wesentlichen Anteil am osmotischen Potential darstellen (KIRST, 1985). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß weitere, hier nicht erfaßte, organische Osmotika (KIRST, 1975a; DICKSON & KIRST, 1986) bei der Turgorregulation von *P. crisper* von Bedeutung sind.

4.1.1.5. Osmotischer Schock und Turgorregulation

Osmotischer Schock:

Der osmotische Downshock war infolge der Wasseraufnahme mit einer erheblichen Volumenzunahme des Protoplasten verbunden; dies bedeutet, daß das Plasmalemma stark vergrößert werden mußte. Möglicherweise bildete das endoplasmatische Retikulum eine "Membranreserve", wie sie für diesen Fall bei *Dunaliella salina* beschrieben wurde (EINSPAHR et al., 1988). Die Versuche zur Thallusdehnung bei *P. crisper* zeigten, daß das Dehnungsmaximum schon bei Inkubation in 3,5‰ erreicht wurde; d.h. durch Inkubation in 0,35‰ konnte der Thallus nicht stärker gedehnt werden. Die sehr dicke Zellwand von *P. crisper* diente hier als mechanisches Widerlager des Protoplasten und bot damit einen guten Schutz vor zu starker Volumenzunahme (REED, 1990).

Bei hyperosmotischem Schock wurde durch Wasserefflux das Volumen des Thallus deutlich reduziert. Die elastische Fähigkeit der Zellwände, dem Osmometer-Verhalten des Protoplasten zu folgen, verhinderte dabei mechanische Schäden am Plasmalemma, die durch Plasmolyse entstehen könnten.

Die physikalischen Eigenschaften der Zellwand haben somit einen wesentlichen Einfluß auf die Salztoleranz von *P. crisper*. Vor allem bei kurzfristigen Änderungen der Salinität folgt die Zellwand den Volumenänderungen der Zelle ("schnelle Reaktion": KIRST, 1985). Neben diesen mechanischen Eigenschaften der Zellwand und ihrer Wirkung als Ionenaustauscher (vgl. 4.1.1.4.) stellen die Zellwände von *P. crisper* auch einen komplizierten Quellkörper dar. Die Volumenänderungen toter Thalli zeigten, daß das externe Ionenmilieu für den Quellungsstatus der Zellwände von Bedeutung ist. Die Quellung in schwach hypersalinen Medien (vgl. Grafik 17)

und die Entquellung der Zellwand in stark hyposalinem Milieu (vgl. Grafik 18) sind ein Hinweis auf den "primären Ioneneffekt". Dabei wird die Quellung durch die Hydrathüllen der eingelagerten Ionen verstärkt (BRAUNER & BUKATSCH, 1964). Die Kontraktion toter Thalli in 175‰ ist dagegen auf den "sekundären Ioneneffekt" (BRAUNER & BUKATSCH, 1964) zurückzuführen. Hier konkurrieren die externen Ionen mit der Zellwand um Wasser, das sich als Hydrathülle um die externen Ionen lagert und damit nicht mehr für die Quellung der Zellwand zur Verfügung steht. Untersuchungen an *Ulva pertusa* und *Porphyra tenera* (OGATA & TAKADA, 1955) führten zu ähnlichen Ergebnissen.

Kurzfristige Turgorregulation:

Die Turgorregulation nach osmotischem Schock sollte bei *P. crispa* indirekt durch eine Volumenänderung bestimmt werden (vgl. 2.2.14.). Da die Zellwände gute elastische Eigenschaften aufweisen (eigene Beobachtung), hätte eine vollständige Turgorregulation als Rückgang der Volumenänderung sichtbar werden müssen.

Bei *P. crispa* ließ sich nur nach leichtem Upshock ein Rückgang der Volumenänderung beobachten. Da die Thalli ihr ursprüngliches Volumen nicht wieder erreichten, wurde der Turgor vermutlich nur unvollständig reguliert. Bei hypoosmotischem Schock oder starkem hyperosmotischem Schock war innerhalb von 5 Stunden kein Rückgang der Volumenänderung feststellbar. Bei entsprechenden Versuchen mit *Porphyra umbilicalis* erfolgte die Volumenregulation innerhalb von 3 Stunden nach dem Schock (KNOTH & WIENCKE, 1984; WIENCKE et al., 1984). Dabei wurde durch Vakuolenbildung nur das cytoplasmatische Volumen reguliert. Bei *P. crispa* war aber keine kurzfristige Vakuolenbildung nachzuweisen, hier wurde also weder das Thallusvolumen noch das Volumen des Cytoplasmas reguliert. Im allgemeinen ist die Volumen- oder Turgorregulation nach wenigen Stunden abgeschlossen (KIRST, 1985), gelegentlich dauert sie bis zu 2 Tagen. Diese Fristen gelten offenbar auch für Algen mit unvollständiger Turgorregulation wie *Polysiphonia lanosa* (REED, 1983) oder *Enteromorpha prolifera* (YOUNG et al., 1987a).

Bei vielen Algen wird die Turgorregulation durch das Angebot von Licht (KIRST, 1975a; EDWARDS et al., 1987) oder organischen Speicherstoffen (HELLEBUST & LIN, 1989; GIMMLER & MÖLLER, 1981) beeinflusst. Bei *P. crispa* war ein solcher Einfluß auf die Volumenregulation in den ersten 5 Stunden nach dem Upshock nicht erkennbar. Da die Dauer dieser Versuche aus technischen Gründen auf 5 Stunden beschränkt werden mußte, wurde für die Beurteilung einer längerfristigen Turgorregulation auf die Analyse der osmotisch wirksamen Inhaltsstoffe zurückgegriffen.

Längerfristige Turgorregulation:

Nach 14-tägiger Kultur in hypoosmotischem Milieu waren die Ionengehalte relativ unverändert gegenüber der Normalkultur (35‰). Da inzwischen durch das Thalluswachstum eine Verdoppelung des Frischgewichtes erfolgt war, wurden also trotz des erhöhten Turgors noch zusätzliche Ionen aufgenommen. Der so wiedererreichte Ionenlevel stellte vermutlich den Mindestbedarf für den Zellstoffwechsel von *P. crisper* dar. Dagegen waren die Konzentrationen einiger organischer Osmotika deutlich reduziert. Diese Abnahme ist nicht allein durch eine Verdünnung infolge der Frischgewichtszunahme zu erklären. Bei der Diatomee *Phaeodactylum tricorneratum* wurde nach einem Downshock die Abgabe von Prolin ins Kulturmedium beobachtet (SCHOBERT, 1980), ähnliches ist auch für andere organische Osmotika beobachtet worden (KIRST, 1977b). Außerdem legt die leichte Vergrößerung der Stärkekörner im Chloroplasten nahe, daß hier ein Umbau in osmotisch inaktive Speicherstoffe stattgefunden hatte. Berechnet man aus den gefundenen Konzentrationen der verschiedenen anorganischen und organischen Osmotika das osmotische Potential des Protoplasten (vgl. Grafik 10), so war das osmotische Potential der Zellen erheblich höher als das des Mediums. Der daraus berechnete maximal erreichte Turgor von ca. 2,1 MPa in der 0,35‰-Kultur lag aber durchaus im Bereich dessen, was Zellen mit stabiler Zellwand ertragen können (ZIMMERMANN, 1978). Auch bei *Enteromorpha prolifera* wurde ein erhöhter Turgor nach dem Downshock beobachtet; hier hatten sich die internen Konzentrationen der osmotisch wirksamen Substanzen ebenfalls nur geringfügig verändert (YOUNG et al., 1987a). Bei *P. crisper* belegten die unveränderten Raten von Wachstum, Photosynthese und Atmung, daß im hypoosmotischen Bereich offenbar keine weitergehende Turgorregulation notwendig war.

Anhand der häufigsten Ionen K^+ , Na^+ und HPO_4^{2-} konnte gezeigt werden, daß sich die Ionen in den Zellen der hypersalinen Kulturen sehr langsam anreicherten. Die Aufnahme erfolgte relativ gleichmäßig über die gesamte Kulturdauer von 14 Tagen. Es ist daher fraglich, ob die Ionenanreicherung bei *P. crisper* ein Effekt aktiver Transportprozesse ist.

Zur Beurteilung, ob die Ionenaufnahme ein aktiver, d.h. energie-abhängiger Prozeß ist oder ob die Konzentrationsunterschiede einer passiven Verteilung folgen, kann die Berechnung der Nernst-Potentiale dienen. Nach 14 Kulturtagen ergeben sich folgende Werte für die 70‰-Kultur (bzw. 175‰-Kultur) bei 4 °C:

$$\begin{aligned} Na^+ &+53 \text{ mV (+91 mV); } K^+ -63 \text{ mV (-19 mV);} \\ HPO_4^{2-} &+12 \text{ mV (+2 mV); } Cl^- -120 \text{ mV (-124 mV)} \end{aligned}$$

Geht man davon aus, daß das Membranpotential mariner Algen bei ca. -70 bis -100 mV liegt (KIRST 1990), so befanden sich bestenfalls K^+ und Cl^- im Gleichgewichtszustand (passive Verteilung), während die Verteilung von Na^+ und HPO_4^{2-} in jedem Falle aktiv, d.h. unter Energieverbrauch erfolgt ist.

Nach 14-tägiger Kultur in 70‰ erreichte das berechnete osmotische Potential der Zellen nur beinahe den Wert des osmotischen Potentials im Medium. Es muß bei diesen Berechnungen allerdings berücksichtigt werden, daß das nichtosmotische Volumen des Thallus (50%) nur geschätzt werden konnte. Zusätzlich zur Zellwand, die ca. 50% des Thallusvolumens ausmachte, gab es in den Zellen von *P. crista* weitere nichtosmotische Bestandteile. Hier sind in erster Linie die lipophilen Globuli im Cytoplasma und die Stärkekörner im Chloroplasten zu nennen, deren Volumen nicht abgeschätzt und berücksichtigt werden konnte. Unter der weiteren Voraussetzung, daß die Liste der hier untersuchten Inhaltsstoffe nicht vollständig ist, läßt sich vermuten, daß in der 70‰-Kultur nach 14 Tagen ein Ausgleich der osmotischen Potentiale von Protoplast und Medium erreicht wurde. Dies würde auch die hohen Ionengehalte in diesen Proben erklären und wäre ein deutlicher Hinweis auf eine Turgorregulation mit Hilfe dieser Ionen. Die Turgorregulation mit Ionen ist energetisch viel günstiger als die Regulation mit organischen Osmotika (BISSON & KIRST, 1979). Darin liegt ein wichtiger Vorteil für die Alge, weil die Energieversorgung (Photosynthese) durch den Salzstreß beeinträchtigt war. Da hohe Ionenkonzentrationen im Cytoplasma toxisch sind, müssen die angereicherten Ionen in Vakuolen kompartimentiert werden. Solche Vakuolen konnten in *P. crista* unter höheren Salinitäten nachgewiesen werden, ihr Auftreten war mit dem Anstieg der intrazellulären Ionenkonzentrationen korreliert. Cytoplasmareiche Arten ohne Vakuolen nutzen oft organische Osmotika zur Turgorregulation. Durch die Fähigkeit, unter Salzstreß Vakuolen zu bilden, kann *P. crista* sowohl Ionen als auch organische Osmotika zur Turgorregulation nutzen.

Auch nach 14-tägiger Kultur in 70‰ konnten noch Photosynthese und Atmung gemessen werden, also reichte die unvollständige Turgorregulation offenbar aus, um noch geringe Stoffwechsel-Aktivitäten aufrecht zu erhalten. Gleichzeitig ermöglichte dieser Stoffwechsel die Turgorregulation.

Aus der Analyse der Phosphatgehalte in der 175‰-Kultur (vgl. 4.1.1.4.) läßt sich weiterhin folgende Hypothese ableiten:

Für die Aufnahme von Phosphat aus dem Kulturmedium hätte Energie aufgewendet werden müssen (vgl. oben), diese stand aber wegen der Beeinträchtigung von Photosynthese und Atmung (vgl. Grafik 12 - 14) nicht mehr zur Verfügung. Daher ist der Gesamt-Phosphatgehalt und in der 175‰-Kultur nahezu unverändert gegenüber den Ausgangsbedingungen in 35‰ (vgl. Grafik 26). Als alles vorhandene Polyphosphat zu HPO_4^{2-} umgesetzt war, konnten keine weiteren Kationen aus dem Medium aufgenommen werden, da die erforderlichen Gegenionen fehlten. Dies würde erklären, warum in der 175‰-Kultur geringere Ionengehalte als in der 70‰-Kultur gemessen wurden. Außerdem war das osmotische Potential des Mediums in der 175‰-Kultur so hoch, daß ein Ausgleich durch Ionenanreicherung im Protoplasten unmöglich wurde. Daher konnte keine Turgorregulation mehr stattfinden.

Nur in der 175‰-Kultur wurde unmittelbar nach dem Upshock erodierte Stärke beobachtet. Der Gehalt an organischen Osmotika war nach 14 Tagen in dieser Kultur am höchsten, hierin ergibt sich eine weitere gute Übereinstimmung zwischen Ultrastruktur und physiologischer Beobachtung. Wegen des geringeren Energiebedarfs (BISSON & KIRST, 1979) wäre aber eigentlich eine bevorzugte Ionenaufnahme für die Turgorregulation zu erwarten gewesen. Jedoch können Energie und organische Osmotika bei gestörter Photosynthese auch aus dem Abbau von Reservestoffen gewonnen werden (HELLEBUST & LIN; 1989). Da die Zellen von *P. crista* reichlich Reservestärke enthielten, war der Umbau zu organischen Osmotika möglicherweise doch energetisch günstiger. Dies wäre eine weitere Erklärung für das Auftreten erodierter Stärke.

Einige Stunden nach dem Upshock auf 175‰ waren Photosynthese und Atmung wieder mit geringen Raten nachweisbar. Dadurch wurde offenbar die Anreicherung weiterer organischer Osmotika ermöglicht, ohne daß der Stärkegehalt innerhalb von 14 Tagen stark reduziert wurde.

Nach 14 Tagen in 175‰ waren Photosynthese und Atmung nicht mehr nachweisbar. Für das Überdauern langfristiger Streßsituationen ist also der Abbau der Reservestoffe unvermeidlich und daher im elektronenmikroskopischen Bild gut nachweisbar.

Längerfristig wurden bei *P. crista* durch unterschiedlichen Salzstreß offenbar unterschiedliche Regulationsmechanismen in Gang gesetzt. In der 70‰-Kultur erfolgte die Regulation hauptsächlich durch Ionen, deshalb wurden hier nach ca. 1 Tag Vakuolen gebildet. In der 175‰-Kultur entstanden die Vakuolen erst nach einer Woche, es wurde erodierte Stärke beobachtet und der Anteil organischer Osmotika war größer. Zu den unterschiedlichen Regulationsmechanismen und zum Zeitablauf der Regulation bleiben noch viele Fragen offen.

Einfluß der Turgorregulation auf den Habitus:

Die unterschiedlichen Habitusformen nach hypo- oder hyperosmotischer Langzeitkultur könnten eine Folge unterschiedlicher Turgordrucke sein. Es ist gut vorstellbar, daß turgeszente Zellen bei 0,35‰ eine flache Wuchsform des Thallus bedingen, wogegen weniger turgeszente Zellen (175‰) zu einem starken Kräuseln des Thallus führen. Als Modellvorstellung bietet sich eine prall gefüllte Luftmatraze an; sie läßt sich nicht aufrollen. Die Entstehung größerer Thalli unter hypoosmotischen Bedingungen (vgl. 3.1.1.) ist auch an *Prasiola stipitata* nachgewiesen worden (RUSSELL, pers. Mitteilung).

Zusammenhang zwischen Turgorregulation und Habitat:

Bei Arten des Eulitorals oder der Brackwasserzone muß die Geschwindigkeit der Turgorregulation dem Zeitintervall der Tide (12 Stunden) angepasst sein. Die Turgorregulation mit organischen Osmotika ist in dieser Frist nicht möglich. Aus energetischen Gründen regulieren die Arten dieser Habitate daher ihren Turgor mit Ionen (BISSON & KIRST, 1979), oder sie ertragen eine unvollständige Turgorregulation (REED, 1983). Die unvollständige Turgorregulation bei *P. crista* kann daher als Anpassung an Habitate mit rasch veränderlichem Salzgehalt interpretiert werden.

4.1.2. Ultrastruktur

4.1.2.1. Vakuolen

Viele Algen, die unter normalen Bedingungen keine Vakuolen haben, bilden diese unter osmotischem Streß. Entstehen die Vakuolen unter hypoosmotischen Bedingungen, so dienen sie vermutlich als Kompartimente für das passiv eingeströmte Wasser und dienen damit der Kontrolle des Cytoplasma-Volumens (KIRST, 1990). Beispiele für diese "hypoosmotische Vakuolenbildung" sind *Porphyra purpurea* (REED et al., 1980), *Porphyra umbilicalis* (WIENCKE & LÄUCHLI, 1980) und *Tetraselmis (Platymonas) subcordiformis* (KIRST & KRAMER, 1981). Da die Zellen von *P. crispera* durch die Zellwände vor zu großer Volumenzunahme geschützt sind, wurde der weitere Einstrom von Wasser durch die Ausbildung eines Turgordrucks verhindert. Eine Volumenkontrolle mittels Vakuolenbildung fand nicht statt, die physiologischen Leistungen (vgl. 4.1.1.1. + 4.1.1.2.) waren dadurch nicht beeinträchtigt.

Bei der "hyperosmotischen Vakuolenbildung" unter erhöhten Salinitäten dienen die Vakuolen als Kompartimente für Ionen. Neben der Kontrolle des cytoplasmatischen Volumens werden die Ionen damit aus dem Cytoplasma entfernt und toxische Einflüsse der Ionen auf das Cytoplasma vermieden (KIRST, 1990). Diese Vakuolenbildung wurde ebenfalls an *Porphyra umbilicalis* ausführlich untersucht (KNOTH & WIENCKE, 1984; WIENCKE & LÄUCHLI, 1983; WIENCKE et al., 1983). Es konnte gezeigt werden, daß die unter Salzstreß angereicherten Ionen Na⁺ und Cl⁻ hauptsächlich in den Vakuolen lokalisiert waren (WIENCKE et al., 1984). Das Gesamtvolumen der Vakuolen hing dabei von der Stärke des osmotischen Stresses ab. Auch in *Dunaliella parva* konnten unter Salzstreß Vakuolen mit Na⁺ und Cl⁻ nachgewiesen werden (HAJIBAGHERI et al., 1986). Bei *P. crispera* wurde nur unter hypersalinen Bedingungen Vakuolenbildung beobachtet. Es ist zu vermuten, daß diese Vakuolen als Ionen-Kompartimente dienten. Da die Präparation für die elektronenmikroskopische Elementanalyse (EDXA oder EELS) sehr schwierig war, konnten die Ionenkonzentrationen in den Vakuolen nicht bestimmt werden.

Bei *Porphyra umbilicalis* wurden die Vakuolen innerhalb einer Stunde nach dem osmotischen Schock gebildet, danach nahm das Gesamtvolumen der Vakuolen nicht mehr zu (KNOTH & WIENCKE, 1984). Dagegen entstanden die Vakuolen bei *P. crispera* langsamer. Erste Vakuolen waren in der 70‰-Kultur nach 1 Tag, in der 175‰-Kultur nach mehreren Tagen sichtbar. Da die Zellen der 70‰-Kultur mehr Ionen enthielten als die der 175‰-Kultur, dienten die Vakuolen bei *P. crispera*

vermutlich nur als Ionenspeicher. Eine Regulation des Zellvolumens konnte nicht beobachtet werden, daher scheidet eine solche Funktion der Vakuolen bei *P. crispa* aus. Möglicherweise wird aber längerfristig das cytoplasmatische Volumen durch die Vakuolenbildung reguliert. Auch bei *Porphyra umbilicalis* wird das cytoplasmatische Volumen reguliert (WIENCKE et al., 1984).

Bei *Tetraselmis (Platymonas) subcordiformis* wurde die Entstehung von Vakuolen aus Golgi-Vesikeln beobachtet (KIRST & KRAMER, 1981). Zahlreiche Vesikel im Cytoplasma salzgestreifter Zellen von *P. crispa* (vgl. Abb. 24) lassen vermuten, daß die Vakuolen hier ebenso entstanden sind.

4.1.2.2. Chloroplasten

Stärke:

Da die enzymatische Bestimmung der Stärke in den Chloroplasten von *P. crispa* keine verlässlichen Ergebnisse zeigte, konnten Veränderungen im Stärkegehalt nur anhand der elektronenmikroskopischen Bilder analysiert werden. Innerhalb der ersten 14 Tage waren die Veränderungen im Stärkegehalt relativ gering, ein Bezug zu den analysierten organischen Osmotika (vgl. Grafik 9) ließ sich daher nur schwer herstellen. Es zeigte sich jedoch kein Widerspruch zwischen elektronenmikroskopischen und physiologischen Daten. Es ist zu vermuten, daß unter hypoosmotischen Bedingungen organische Osmotika dem Cytoplasma entzogen werden. Die daraus gebildete Stärke ist osmotisch unwirksam. Vice versa wird unter hyperosmotischen Bedingungen Stärke zu organischen Osmotika umgebaut. Die deutlichen Veränderungen im Stärkegehalt nach längerer Kulturdauer (vgl. Abb. 21 + 26) bestätigen diese Vermutung. Ähnliche Beobachtungen wurden an den Stärkekörnern von *Porphyra umbilicalis* gemacht; dort wurde die Florideen-Stärke während ca. 1 Woche zu Floridosid und Isofloridosid umgesetzt (WIENCKE & LÄUCHLI, 1981).

Ein weiterer Hinweis auf die Funktion der Stärke als Vorrat für organische Osmotika ist das Auftreten der Erosionsspuren nach dem Upshock (vgl. Abb. 27 + 28). Bei der Keimung von Getreide wurden sehr ähnliche Strukturen beobachtet und als "erodierte Stärke" beschrieben. Die Löcher und Riefen in den Stärkekörnern wurden mit der Anordnung abbauender Enzyme in Zusammenhang gebracht (HANSELMANN, 1981). Bei *P. crispa* konnten diese Strukturen nur in den Präparaten dargestellt werden, die direkt nach osmotischem Upshock auf 175‰ fixiert wurden. Nach Upshock auf 70‰ waren keine Erosionsmuster sichtbar. Dies paßt zu der Beobachtung, daß die organischen Osmotika in der 175‰-Kultur einen größeren Anteil am osmotischen Potential bildeten. Außerdem war in dieser Kultur längerfristig

keine Photosynthese mehr nachweisbar, so daß ein Energiemangel bestand (vgl. 4.1.1.2.).

Aufgrund der teilweise schlechten Strukturhaltung kann aber nicht ganz ausgeschlossen werden, daß es sich bei der Darstellung der erodierten Stärke um einen Artefakt handelt.

Thylakoide und Plastoglobuli:

Die vermehrt sichtbaren Thylakoide stimmten mit der Anreicherung von Chlorophyll unter erhöhten Salinitäten (vgl. Grafik 11) überein. Die verminderte Zellteilungs-Rate hat die Anreicherung von Thylakoiden sicherlich begünstigt. Da der lichtgetriebene Elektronenfluß im Algen-Chloroplasten eine wichtige Rolle bei der Reduktion von NO_3^- spielt (RICHTER, 1988), besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen den vermehrten Thylakoiden und der NH_4^+ -Anreicherung unter höheren Salinitäten.

Bei *P. crispera* wurden unter Salzstreß vermehrt Plastoglobuli beobachtet. Plastoglobuli werden als Kennzeichen alternder oder geschädigter Chloroplasten beschrieben (v. DENFFER, 1983). Diese Interpretation paßt gut zu der Vermutung, daß die Zellteilungsrate bei *P. crispera* unter Salzstreß reduziert war. Dadurch wurde das Alter der Zellen und damit auch das Alter der Chloroplasten erhöht.

In dem antarktischen Moos *Ceratodon purpureus* dienen Plastoglobuli als Schutz vor zu hohen Lichtintensitäten (POST, 1990). Allerdings waren die Lichtintensitäten während der Kulturhaltung ($70 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$) für eine starklichttolerante Alge wie *P. crispera* nicht hoch. Die Photosynthese-Lichtkurve in 70‰ (Grafik 13) zeigte zwischen $100 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ und $200 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ noch einen Anstieg der O_2 -Produktion. Eine Licht-Schädigung durch die Beleuchtung mit $70 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ in der Kultur ist daher unwahrscheinlich.

4.2. Versuche zur Austrocknung

4.2.1. Physiologie

4.2.1.1. Austrocknung

Die Morphologie des Algethallus hat einen Einfluß auf seine Austrocknungsgeschwindigkeit. Die festen Thalli von *Fucus distichus* hatten nach 3 Stunden 80% ihres Zellwassers verloren, die zarteren Thalli von *Ulva fenestrata* innerhalb von 2 Stunden (QUADIR et al., 1979). Nach dieser Phase blieb der Wassergehalt in beiden Arten relativ konstant. Obwohl die Thalli von *P. crista* denen von *Ulva* morphologisch sehr ähnlich sind, dauerte eine entsprechende Wasserabgabe hier 6-8 Stunden; dabei war der Einfluß der relativen Luftfeuchtigkeit auf die Trocknungsgeschwindigkeit gering. Ein wichtiger Grund für den besseren Trockenschutz von *P. crista* lag möglicherweise in der chemischen Zusammensetzung der Zellwand (KLOAREG & QUATRANO, 1988). Der hohe Anteil an Pektinen (vgl. 3.1.3.1.) wurde bereits 1936 von KNEBEL lichtmikroskopisch nachgewiesen und begünstigte die Quellung der Zellwand sowie deren Wasserspeicherung. Außerdem erschwerte die Imprägnierung der Zellwand (die Substanz der lipophilen Globuli, vgl. 4.2.3.) die Wasserabgabe. Weiterhin reduziert die krause Wuchsform der Thalli deren Oberfläche und schafft geschützte Innenräume, in denen das Haftwasser gut vor Verdunstung geschützt ist. Solche Wasserreste wurden bei trockenfallenden *Fucus*- oder *Cladophora*-Thalli beobachtet (KIRST, 1990).

Dieser Verdunstungsschutz von *P. crista* durch die Zellwände ist allerdings eine Besonderheit. Im allgemeinen wird die Austrocknungsgeschwindigkeit vom Verhältnis der Thallusoberfläche zum Thallusvolumen bestimmt und nicht von der Zellwanddicke (DROMGOOLE, 1980). Da die Trockenzeiten im Supralitoral sehr lang dauern können (keine regelmäßige Benetzung durch die Flut) kann der Verdunstungsschutz von *P. crista* nicht der alleinige Grund für die Austrocknungsresistenz sein. So stellte schon BIEBL (1938) fest, daß es keinen Zusammenhang zwischen Austrocknungsgeschwindigkeit und bevorzugtem Habitat gibt. Vielmehr ist die Fähigkeit, Austrocknung zu ertragen, für die Verbreitung der Algen maßgeblich (DAVISON et al., 1989). Während der maximale ("kritische") Wasserverlust bei der sublitoralen *Laminaria digitata* bei 55% liegt, erträgt *Fucus spiralis* im oberen Eulitoral bis zu 90% Wasserverlust (DRING & BROWN, 1982). Dies war auch für *P. crista* die kritische Grenze (Grafik 24).

4.2.1.2. Photosynthese und Atmung

In der Gasphase:

Während der Austrocknung der Thalli von *P. crista* war die Netto-Photosynthese gegenüber der PES-Kultur (vgl. Grafik 12) deutlich reduziert, dies wurde durch einen qualitativen Test im Labor nachgewiesen. Genauere Messungen der Photosynthese- und Atmungsraten wurden von BECKER (1982) in der Antarktis durchgeführt. Die dort gefundenen Werte für *P. crista* (ohne anhaftendes Wasser) lagen um den Faktor 10 unter den Werten, die hier in der PES-Kultur gemessen wurden. Damit ergibt sich eine gute Übereinstimmung beider Versuche.

Bei anderen Algen kann eine geringe Austrocknung die Photosynthese stimulieren, erst ein größerer Wasserverlust führt dann zur Abnahme der Photosyntheserate. So wurde bei 3 *Fucus*-Arten und bei *Laminaria digitata* eine Steigerung der Photosyntheserate nach ca. 20% Austrocknung gemessen (DRING & BROWN, 1982). Auch bei *Ulva fenestrata* wurde die Photosynthese durch 20% Wasserverlust angeregt, durch die stärker ansteigende Atmungsrate kam es hier aber zu einer Abnahme der Netto-Photosynthese (QUADIR et al., 1979). Die Steigerung des Gaswechsels bei Austrocknung wurde bei Flechten auf eine verbesserte Diffusion in den Zellwänden zurückgeführt (LANGE & KILIAN, 1985). Dabei sind blaugrüne Phycobionten empfindlicher gegen Wasserverlust als symbiotische Grünalgen (LANGE et al., 1989). Der Einfluß der Austrocknung auf die Photosynthese ist für die Flechten und für ihre isolierten Phycobionten gleich (LANGE et al., 1990). *P. crista* wurde in der Antarktis auch als Phycobiont der Flechte *Mastodia tessellata* gefunden (KAPPEN et al., 1987). Freilandexperimente mit *Mastodia tessellata* zeigten ebenfalls eine geringfügig erhöhte CO₂-Aufnahme bei leichtem Wasserverlust (HUISKES, pers. Mitteilung). Wegen der mächtigen Zellwände wäre auch bei *P. crista* eine Steigerung der Photosynthese durch eine Verringerung des Diffusionswiderstandes (Austrocknung) gut vorstellbar. Die o.a. Ergebnisse zeigten aber, daß die Photosynthese von *P. crista* auch bei geringem Wasserverlust schon stark reduziert wurde. Eine Ursache dafür könnte das unterschiedliche Angebot an Kohlenstoff sein. Während in der Gasphase der Kohlenstoff als CO₂ vorliegt, wird im Meerwasser (bei pH-Werten um 8) hauptsächlich HCO₃⁻ angeboten. HCO₃⁻ wurde von *Iridaea cordata* besser umgesetzt als CO₂ (THOMAS & TREGUNNA, 1970) und limitiert offenbar auch bei anderen marinen Algen die Photosynthese (BIDWELL & McLACHLAN, 1985). Die Verminderung der Atmungsrate von *P. crista* ist dadurch allerdings nicht erklärbar.

Trotz der starken Reduktion der gemessenen Gaswechselraten gab es Hinweise darauf, daß Photosynthese bei *P. crisper* bis zu einem Wasserverlust von 70% möglich ist. In diesem Bereich lag auch der maximale Wasserverlust für die anderen o.g. Algen (QUADIR et al., 1979; DRING & BROWN, 1982). Die Autoren interpretierten dies als wichtige Anpassung an das Leben im Eulitoral.

Nach Wiederbenetzung:

Unmittelbar nach der Wiederbenetzung waren Photosynthese und Atmung in allen Proben von *P. crisper* meßbar. Die Photosyntheseraten waren dabei auf ca. 25% reduziert, gleichgültig wie lange die Thalli vorher getrocknet waren.

Im Gegensatz dazu war bei verschiedenen Algen des Eulitorals ein klarer Zusammenhang zwischen Austrocknungsdauer und nachfolgender Photosynthese feststellbar (BROWN, 1987). Die Photosyntheseraten nach geringem Wasserverlust lagen bei allen Arten nur wenig unter den Kontrollraten (vor Austrocknung). Deutliche Unterschiede zeigten sich auch nach längerer Wiederbenetzung. Die Arten des oberen Eulitorals (*Bostrychia arbuscula*, *Apophloea lyallii*) erreichten höhere Photosyntheseraten als die Arten des unteren Eulitorals (*Hormosira banksii*, *Xiphophora chondrophylla*). BROWN's Schlußfolgerungen wurden auch durch die Meßwerte für *P. crisper* bestätigt: Die gute Regeneration der Photosynthese nach längerer Wiederbenetzung entspricht den Erwartungen für eine Art des Supralitorals. Sie ist ein typisches Kennzeichen der Austrocknungsresistenz (WILTENS et al., 1978).

Freilandexperimente mit *P. crisper* in der Antarktis (DAVEY, 1989) zeigten, daß die ursprünglichen Photosyntheseraten schon nach 6-12 Stunden Wiederbenetzung erreicht wurden. Dies stimmt gut mit den hier durchgeführten Laborexperimenten überein, in beiden Fällen traten große Schwankungen in den Meßwerten paralleler Proben auf. DAVEY beobachtete weiterhin, daß die Austrocknung der Thalli häufig zum Absterben von *P. crisper* führt (DAVEY, 1988; 1989). Da im Labor das Gegenteil festgestellt wurde, sind die Unterschiede in den verschiedenen Methoden zu suchen:

1. Bei DAVEY wurden die Thalli während der Austrocknung belichtet. Bei höheren Wasserverlusten wird die Elektronen-Transportkette der Photosysteme unterbrochen (WILTENS et al., 1978). Da schon ein einfacher Thallus von *P. crisper* 50% des einfallenden Lichtes absorbiert (DAVEY, 1989), können durch die Belichtung Radikale entstehen, die die Zellen schädigen. Auf die Bedeutung dieser Schäden haben SATOH et al. (1983) im Zusammenhang mit der Salztoleranz hingewiesen. Außerdem wurden die Thalli möglicherweise durch die absorbierte Strahlung erwärmt, was ebenfalls zu Zelldefekten geführt haben könnte. In den Laborversuchen

wurde *P. crista* im Dunkeln getrocknet, damit wurden die oben beschriebenen Lichtschäden vermieden.

2. DAVEY benutzte die Färbung mit Auramine O als Vitalitätstest. Die Laborversuche zeigten aber, daß die Vitalfärbung bei *P. crista* schwierig ist und zu Fehlinterpretationen führen kann (vgl. 2.2.7.).

4.2.1.3. Wuchsraten

Die Wuchsraten nach Austrocknung und Wiederbenetzung der Thalli wurden von der Trocknungsdauer und vom Wasserverlust bestimmt. Obwohl die Austrocknungsdauer natürlich ihrerseits den Wasserverlust bedingte, hatten beide Faktoren offenbar einen getrennten Einfluß auf die Wuchsraten. Dies wird vor allem durch die großen Unterschiede in den Wuchsraten nach vergleichbarem Wasserverlust deutlich (vgl. Grafik 24). Aus Grafik 22 wird gefolgert, daß der Vorgang der Wasserabgabe vermutlich eine stärkere Beeinträchtigung der Alge darstellt als der Wasserverlust selbst. Dadurch würde erklärt, daß die WR während der Austrocknung (<5 Stunden) stärker reduziert wurden als nach Erreichen eines stabilen Zustandes (5-9 Stunden). Die Trocknungszeit von 5-9 Stunden ist für die Alge offenbar günstig, dies zeigte sich auch bei den Versuchen mit Silicagel. Hier lagen die Wuchsraten nach 5-9 Stunden erheblich über den Raten der normal getrockneten Thalli (Grafik 24), bei denen der gleiche Wasserverlust (86%) eingetreten war. Eine Anpassung an das Trockenliegen für 5-9 Stunden ist ökologisch sinnvoll. Solche Trockenzeiten treten bei einem Tideintervall von 12 Stunden in der oberen Gezeitenzone häufig auf.

Erst bei längerer Austrocknung (> 10 Stunden) bestimmte der Zeitfaktor allein die Wuchsraten. Bei veränderter Austrocknung der Thalli (Grafik 23, Feuchtekammer) zeigten die großen Schwankungen in den Wuchsraten (Standardabweichungen!) ebenfalls den Einfluß der Trocknungsdauer. Bei verschiedenen *Polysiphonia*-Arten konnte sogar ein Absterben nach 1-tägiger Lagerung in Feuchtekammern beobachtet werden (BIEBL, 1938).

4.2.2. Ultrastruktur

Für die Fähigkeit, Austrocknung zu ertragen, gibt es wichtige ultrastrukturelle Voraussetzungen. Ein Vorteil ist das Fehlen einer Zentralvakuole, die durch den Wasserentzug stark beschädigt werden könnte. Algen ohne Vakuolen, wie *P. crista*, zeigen daher im allgemeinen eine bessere Austrocknungs-Resistenz (BIEBL, 1938). DAVISON et al. (1989) fanden bei Experimenten zur Gefrierresistenz, daß Schäden am Plasmalemma entstehen, die dessen Semipermeabilität zerstören. Wegen der Ähnlichkeit von Austrocknungs- und Gefrierstreß (GUY, 1990) kann man vermuten, daß das Plasmalemma auch bei der Austrocknungstoleranz von *P. crista* eine wichtige Rolle spielt. Weiterhin ist auch die elastische Verformbarkeit der Zellwände ein wichtiger Schutzfaktor (vgl. 4.1.1.5).

In der Ultrastruktur von *P. crista* wurden nach der Austrocknung nur geringe Veränderungen festgestellt. Die hohe Dichte von Cytoplasma und Chloroplastenmatrix, erkenntlich am starken Kontrast im elektronenmikroskopischen Bild, stabilisierte offenbar die Ultrastruktur während des Wasserverlustes. In diesem Zusammenhang sind auch die hohen Prolin-Gehalte im Zellinnern wichtig (vgl. 4.1.1.4.). Daß es schon nach wenigen Stunden zu einer deutlichen Abnahme des Wassergehaltes im Cytoplasma gekommen ist, wird durch das Zusammenfließen der lipophilen Globuli belegt. Hier wurde die hydrophile Barriere zwischen den einzelnen Globuli durch den Wasserentzug entfernt. Die konkave Verformung der Zellkerne ist ein weiteres Merkmal der Austrocknung. Soweit Membranen dargestellt werden konnten, wirkten sie unversehrt; die Thylakoide der Chloroplasten waren nicht aufgebläht, wie es von NOAILLES (1978) bei Trockenschäden an Moosen beobachtet wurde. Angeschwollene Thylakoide wurden auch bei *Tetraselmis (Platymonas)* unter Salzstreß beobachtet (KIRST & KRAMER, 1981). Salzstreß und Austrocknung zeigen oft ähnliche Effekte auf die Zellstruktur, da beide eine Verminderung des verfügbaren Wassers zur Folge haben (SMITH et al., 1986). Es ist allerdings möglich, daß die Schäden nicht beim Austrocknen entstehen, sondern erst bei der Wiederbenetzung (WILTENS et al., 1978). Bei *P. crista* ist aber wegen der guten physiologischen Leistungen (vgl. 4.2.1.2. + 4.2.1.3.) nicht mit Schäden durch die Wiederbenetzung zu rechnen.

4.2.3. Zellwand und Globuli

Erst nach sehr langer Störung der Photosynthese (mehrere Monate bis 1 Jahr im Dunkel) war eine Reduktion der lipophilen Globuli im Cytoplasma von *P. crista* zu erkennen (eigene Beobachtung). Da die Reservestoffe (Stärke) zu diesem Zeitpunkt längst verbraucht waren, ist eine Funktion der Globuli als Speicherstoffe auszuschließen. Vermutlich besteht ein Zusammenhang zwischen den Globuli im Cytoplasma und den Inkrustierungen der Zellwand. Das gleiche Verhalten bei der Nachkontrastierung läßt auf eine stoffliche Übereinstimmung schließen. Bei *Fucus distichus* wurden ungesättigte Fettsäuren in der Zellwand beschrieben, die dort als "falsche Kutikula" einen Austrocknungsschutz bilden (QUADIR et al., 1979). Da vermutlich auch die Globuli und Zellwand-Inkrusten von *P. crista* aus ungesättigten Fettsäuren bestehen, ergibt sich hierin eine genaue Übereinstimmung zu *Fucus*. Die Diffusionsbarriere durch die "falsche Kutikula" konnte bei *P. crista* auch durch die Neutralrotfärbung nachgewiesen werden (vgl. 3.1.1.). Außerdem könnten die reduzierten Wuchsraten nach dem Abtupfen (vgl. 2.2.3.) durch Schäden an der "falschen Kutikula" bedingt sein. Die lipophile Substanz wurde offenbar sehr langsam durch die Zellwand nach außen abgegeben, der große Vorrat kann als gute Anpassung an längere Trockenperioden interpretiert werden. Da auch im Cytoplasma von *Prasiola stipitata* zahlreiche Fettkörperchen nachgewiesen wurden (FRIEDMANN & MANTON, 1959), ist diese "falsche Kutikula" offenbar eine gute Voraussetzung für das Leben im Eu- oder Supralitoral.

4.3. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Hypoosmotische Medien (im Extremfall Süßwasserbedingungen) stellen für *P. crista* keinen Streß dar. Dies wird durch nahezu konstante physiologische Leistungen und eine unveränderte Ultrastruktur belegt. Die dicke Zellwand ist dabei sicherlich ein sehr wichtiger Schutzfaktor. In der Antarktis gibt es jährlich ca. 181 Regentage und 167 SchneefallTage (BARSCH et al., 1985). Dadurch kommt es im Supralitoral der Antarktis häufig zu Aussüßung durch Regen oder Schmelzwasser, *P. crista* ist somit diesem Habitat sehr gut angepasst.

Austrocknung und erhöhte Salinität des Mediums, die durch das reduzierte Wasserpotential einen vergleichbaren Streß darstellen, werden von *P. crista* gut toleriert. Ihre Strategie besteht dabei weniger darin, dem entsprechenden Streßfaktor entgegen zu wirken, als vielmehr den Streß passiv zu ertragen. Durch die vielfältigen Eigenschaften der dicken Zellwände und das "stabile" Plasmalemma ist das Zellinnere gegen plötzliche extreme Belastungen abgeschottet. Daher werden unter erhöhten Salinitäten (über 35‰) oder bei Austrocknung die physiologischen Leistungen zwar stark reduziert, es treten aber keine irreversiblen Schäden auf. Turgorregulation findet nur in sehr begrenztem Umfang und langfristig statt. Die dabei angereicherten Inhaltsstoffe entsprechen weitgehend den bekannten Reaktionen bei anderen Algen. Die Anreicherung von HPO_4^{2-} wurde bisher nicht beschrieben, sie ist mit dem häufigen Vorkommen von *P. crista* auf Vogelbänken zu erklären.

Die Ultrastruktur von *P. crista* spiegelt die physiologischen Eigenschaften wider. Weder durch Salzstreß noch durch Austrocknung kommt es zu dramatischen Veränderungen. Auch hierbei ist die Zellwand als stabilisierender Faktor von Bedeutung. Die lipophilen Globuli im Cytoplasma und ihre mögliche Bedeutung in der Zellwand sind eine Besonderheit von *P. crista*. Vakuolenbildung tritt nur bei Ionenanreicherung auf, längerfristig ist ein Rückgang der Reservestärke zu beobachten. Auch unter extremen Streßbedingungen (175‰ oder 80% Wasserverlust) bleiben die Membransysteme erhalten, dies ist eine wichtige Voraussetzung für die rasche Regeneration.

Dementsprechend tritt auch nach Rückführung in Kontrollbedingungen (35‰) schnell eine vollständige Erholung der Alge ein. Im Habitat ist *P. crista* also bei verbesserten Umweltbedingungen schnell wieder voll leistungsfähig, auch wenn der vorausgegangene Streß mehrere Wochen andauerte. Dies ist im Hinblick auf häufige extreme Wetterlagen (BARSCH et al., 1985) besonders wichtig. Die Möglichkeit, lange Zeiten ohne Licht zu überdauern, ist eine gute Anpassung an die Bedeckung durch Schnee.

Eine gute Toleranz gegenüber Austrocknung und die rasche Regeneration nach der Wiederbenetzung sind wichtige Vorbedingungen für die Gefrierresistenz. Gefrierresistenz ist bei manchen Pflanzen durch vorausgehende Austrocknung induzierbar (GUY, 1990). Getrocknete Thalli von *P. crista* konnten ohne Schäden tiefgefroren werden und zeigten nach dem Auftauen beinahe normale Wachsraten (eigene Beobachtung). Da in der Antarktis jährlich 120 Frostwechseltage auftreten (BARSCH et al., 1985), ist die Gefrierresistenz ein wichtiges Kriterium für dort lebende, atmophytische Algen.

Bei all diesen Leistungen von *P. crista* spielt die Zellwand eine wichtige Rolle. Ihre vielfältigen physikalischen und chemischen Eigenschaften konnten hier nur sehr unvollständig untersucht werden. Da die Zellwand ja das Bindeglied zwischen Protoplast und Umwelt darstellt, wäre eine weitergehende Untersuchung (auch bei anderen Algen) von großem Interesse.

Das umfassende "Aushaltevermögen" und die ausgezeichneten physiologischen Leistungen unter hypoosmotischen Bedingungen lassen die Frage nach dem ursprünglichen Habitat von *P. crista* in einem neuen Licht erscheinen. Im Supralitoral sowie an anderen atmophytischen Standorten ist durch Regen oder auch durch Schmelzwasser häufig mit Süßwasser zu rechnen. Der Eintrag von Seesalz spielt an diesen Standorten vermutlich eine weniger wichtige Rolle.

In der Gattung *Prasiola* gibt es auch Süßwasser-Arten, z.B. *P. calophylla*, mit der *P. crista* (nicht nur wegen des Vorkommens im gleichen Habitat) häufiger verwechselt worden ist (BROADY, 1989a). Die gute Anpassung an hypoosmotische Bedingungen und das Fehlen sulphatierter Zellwände könnten ein Hinweis darauf sein, daß auch *P. crista* ursprünglich eine Süßwasseralge war. Wegen ihrer guten Fähigkeit, ein stark reduziertes Wasserpotential zu ertragen, konnte sie auch andere Habitate besiedeln. Vielleicht ist also

Prasiola crista ssp. *antarctica*
eine Süßwasseralge im Exil.

5. Literaturverzeichnis

- BARSCH, D.; BLÜMEL, W.-D.; FLÜGEL, W.-A.; MÄUSBACHER, R.; STÄBLEIN, G.; ZICK, W. (1985)
Untersuchungen zum Periglazial auf der König-Georg-Insel
Südshetlandinseln/Antarktika.
Berichte zur Polarforschung **24**
- BAUER, R.; HEZEL, U.B.; PARTSCH, R.O. (1985)
Electron Spectroscopic Imaging (ESI).
Mikroskopie Supp. **2/85**, 26-35
- BECKER, E.W. (1982)
Physiological studies on Antarctic *Prasiola crista* and *Nostoc commune*
at low temperatures.
Polar Biology **1**, 99-104
- BIDWELL, R.G.S. & McLACHLAN, J. (1985)
Carbon nutrition of seaweeds: Photosynthesis, photorespiration and respiration.
J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **86**, 15-46
- BIEBL, R. (1938)
Trockenresistenz und osmotische Empfindlichkeit der Meeresalgen
verschieden tiefer Standorte.
Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik **86**, 350-386
- BIEBL, R. (1939)
Protoplasmatische Ökologie der Meeresalgen.
Ber. d. D. Bot. Ges. **57**, 78-90
- BISSON, M.A. & GUTKNECHT, J. (1975)
Osmotic regulation in the marine alga *Codium decorticans*.
I. Regulation of turgor pressure by control of ionic composition.
J. Membr. Biol. **24**, 183-200
- BISSON, M.A. & GUTKNECHT, J. (1980)
Osmotic regulation in algae.
in: Spanswick, R.M.; Lucas, J.W.; Dainty, J. (eds.): Plant Membrane Transport,
Current Conceptual Issues
Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp 131-142
- BISSON, M.A. & KIRST, G.O. (1979)
Osmotic adaptation in the marine alga *Griffithsia monilis* (Rhodophyceae):
The role of ions and organic compounds.
Aust. J. of Plant Physiol. **6**, 523-538
- BOLD, H.C. & WYNNE, M.J. (1985)
Introduction to the algae.
Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA, pp. 191 f

- BOROWITZKA, L.J. (1981)
Solute accumulation and regulation of cell water activity.
in: Paleg, L.G.; Aspinall, D. (eds.):
Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants
Academic Press, Australia pp 97-130
- BRAUNER & BUKATSCH, F. (1964)
Das kleine Pflanzenphysiologische Praktikum.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 7. Auflage, pp 46-48
- BROADY, P.A. (1989a)
The distribution of *Prasiola calophylla* (Carmich.) Menegh. (Chlorophyta) in
Antarctic freshwater and terrestrial habitats.
Antarctic Science 1(2), 109-118
- BROADY, P.A. (1989b)
Broadscale patterns in the distribution of aquatic and terrestrial vegetation
at three ice-free regions on Ross Island, Antarctica.
Hydrobiologia 172, 77-95
- BROWN, A.D. (1976)
Microbial water stress.
Bacteriological Reviews 40/4, 803-846
- BROWN, A.D. & BOROWITZKA, L.J. (1979)
Halotolerance of *Dunaliella*.
in: Levandowsky, M.; Hutner, S.H. (eds.) Biochemistry and Physiology of Protozoa,
New York: Academic 1, 131-190
- BROWN, L.M. & HELLEBUST, J.A. (1978)
Sorbitol and proline as intracellular osmotic solutes in
the green alga *Stichococcus bacillaris*.
Can. J. Bot. 56, 676-679
- BROWN, L.M. & HELLEBUST, J.A. (1980)
The contribution of organic solutes to osmotic balance
in some green and eustigmatophyte algae.
J. Phycol. 16, 265-270
- BROWN, M.T. (1987)
Effects of desiccation on photosynthesis of intertidal algae
from a southern New Zealand shore.
Botanica Marina 30, 121-127
- CATTINI, P.A. & DAVIES, H.G. (1983)
Kinetics of lead citrate staining of thin sections for electron microscopy.
Stain Technology 58/1, 29-40
- CLAYTON, M.N. & WIENKE, C. (1986)
Techniques and equipment for culturing antarctic benthic marine algae,
and for preparing specimens for electron microscopy.
Ser. Cient. INACH 34, 93-97

- CLOUGHLAN, S.J. & HEBER, U. (1982)
The role of glycinebetaine in the protection of spinach thylakoids against freezing stress.
Planta **156**, 62-69
- DAVEY, M.C. (1988)
Ecology of terrestrial algae of the fellfield ecosystems of Signy Island, South Orkney Islands.
Br. Antarct. Surv. Bull. **81**, 69-74
- DAVEY, M.C. (1989)
The effects of freezing and desiccation on photosynthesis and survival of terrestrial antarctic algae and cyanobacteria.
Polar Biology **10**, 29-36
- DAVISON, I.R.; DUDGEON, S.R.; RUAN, H.- M. (1989)
Effect of freezing on seaweed photosynthesis.
Marine ecology progress series **58** 123-131
- v. DENFFER, D. (1983)
Morphologie.
in Strasburger, E.: *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 32. Aufl. pp 62-63
- DICKSON, D.M.J. & KIRST, G.O. (1986)
The role of dimethylsulphoniopropionate, glycine betaine and homarine in the osmoacclimation of *Platymonas subcordiformis*.
Planta **167**, 536-543
- DICKSON, D.M.J.; WYN JONES, R.G.; DAVENPORT, J. (1980)
Steady state osmotic adaptation in *Ulva lactuca*.
Planta **150**, 158-165
- DRING, M.J. & BROWN, F.A. 1982
Photosynthesis of intertidal brown algae during and after periods of emersion: A renewed search for physiological causes of zonation.
Mar. Ecol. Progr. Ser. **8**, 301-308
- DROMGOOLE, F.I. (1980)
Desiccation resistance of intertidal and subtidal algae.
Bot. mar. **23**, 149-159
- EDWARDS, D.M.; REED, R.H.; CHUDEK, J.A.; FOSTER, R.; STEWART, W.D.P. (1987)
Organic solute accumulation in osmotically-stressed *Enteromorpha intestinalis*.
Mar. Biol. **95**, 583-592
- EDWARDS, D.M.; REED, R.H.; STEWART, W.D.P. (1988)
Osmoacclimation in *Enteromorpha intestinalis*: long-term effects of osmotic stress on organic solute accumulation.
Mar. Biol. **98**, 467-476

- EINSPAHR, K.J.; MAEDA, M.; THOMPSON, G.A.jr. (1988)
 Concurrent changes in *Dunaliella salina* ultrastructure and
 membrane phospholipid metabolism after hyperosmotic shock.
 Cell Biol. 107, 529-538
- FRIEDMANN, I. & MANTON, I. (1959)
 Gametes, fertilization and zygote development in *Prasiola stipitata* Suhr.
 Nova Hedwigia 1/3+4, 333-462
- FRÖSCH, D.; BACHHUBER, K.; WESTPHAL, C. (1983)
 Melamine resins - a novel group of water-embedding media for electron microscopy.
 Zeiss Information MEM 2, 42-47
- FRÖSCH, D. & WESTPHAL, C. (1989)
 Melamine resins and their application in electron microscopy.
 Electron Microscopy Reviews 2/2, 231-255
- GESSNER, F. & HAMMER, L. (1960)
 Die Photosynthese von Meerespflanzen in ihrer Beziehung zum Salzgehalt.
 Planta 55, 306-312
- GIMMLER, H. & MÖLLER, E.M. (1981)
 Salinity-dependent regulation of starch and glycerol metabolism in *Dunaliella parva*.
 Plant, Cell and Environment 4, 367-375
- GINZBURG, M. (1987)
Dunaliella: a green alga adapted to salt.
 Adv. Bot. Res. 14, 93-183
- GREENE, S.W.; GRESSITT, J.L.; KOOB, D.; LLANO, G.A.; RUDOLPH, E.D.;
 SINGER, R.; STEERE, W.C.; UGOLINI, F.C. (1967)
 Terrestrial life of Antarctica.
 Publ. Amer. Geogr. Soc. New York, pp 1-24
- GUY, C.L. (1990)
 Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism.
 Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41, 187-223
- HAJIBAGHERI, M.A.; GILMOUR, D.J.; COLLINS, J.C.; FLOWERS, T.J. (1986)
 X-ray microanalysis and ultrastructural studies of cell compartments of *Dunaliella*
parva.
 J. Exp. Bot. 37/184, 1725-1732
- HALLAM, N.D. & LUFF, S.E. (1988)
 The fixation and infiltration of larger brown algae (Phaeophyta)
 for electron microscopy.
 Br. phycol. J. 23, 337-346
- HANSELMANN, K. (1981)
 Dissimilation pflanzlicher Speicherstoffe.
 BioZ 11/1, 15-27

- den HARTOG, C. (1968)
The littoral environment of rocky shores as a border between the sea and the land and between the sea and the fresh water.
Blumea **16/2**, 374-393
- HASTINGS, D.F. & GUTKNECHT, J. (1976)
Ionic relations and the regulation of turgor pressure in the marine alga *Valonia macrophysa*.
J. Membrane Biol. **28**, 263-275
- HAWES, I. & DAVEY, M.C. (1989)
Use of the fluorochrome Auramine O for determination of cell viability in filamentous and thalloid algae.
Phycologia **28/4**, 518-523
- HELLEBUST, J.A. (1976)
Effect of salinity on photosynthesis and mannitol synthesis in the green flagellate *Platymonas suecica*.
Can. J. Bot. **54/15**, 1735-1741
- HELLEBUST, J.A. (1985)
Mechanisms of response to salinity in halotolerant microalgae.
Plant and Soil **89**, 69-81
- HELLEBUST, J.A. & LIN, Y.-H. (1989)
Regulation of glycerol and starch metabolism in *Clamydomonas pulsatilla* in response to changes in salinity.
Plant, Cell and Environment **12**, 621-627
- INSKEEP, W.P. & BLOOM, P.R. (1985)
Extinction coefficients of chlorophyll a and b in N,N-dimethylformamide and 80% acetone.
Plant Physiol. **77**, 483-485
- JACKSON, S.G. & McCANDLESS, E.L. (1978)
Simple, rapid, turbidometric determination of inorganic sulfate and/or protein.
Analytical Biochemistry **90**, 802-808
- KAESER, W. (1989)
Freeze-substitution of plant tissues with a new medium containing dimethoxypropane.
J. Microsc. **154**, 273-278
- KAPPEN, L.; BÖLTER, M.; KÜHN, A. (1987)
Photosynthetic activity of lichens in natural habitats in the maritime Antarctic.
Bibl. Lichenol. **25**, 297-312
- KARSTEN, U. & KIRST, G.O. (1989a)
Intracellular solutes, photosynthesis and respiration of the green alga *Blidingia minima* in response to salinity stress.
Botanica Acta **102**, 123-128
- KARSTEN, U. & KIRST, G.O. (1989b)
Incomplete turgor pressure regulation in the "terrestrial" red alga *Bostrychia scorpioides*.
Plant Sci. **61**, 29-36

- KARSTEN, U.; WIENCKE, C.; KIRST, G.O. (1990)
The β -dimethylsulphoniopropionate (DMSP) content of macroalgae from Antarctica and Southern Chile.
Bot. Mar. **33**, 143-146
- KAUSS, H. (1987)
Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism.
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **38**, 47-72
- KERBY, N.W.; REED, R.H.; ROWELL, P. (1989)
Separation of algal organic osmolytes by high-performance liquid chromatography.
Journal of Chromatography **479**, 353-360
- KIRST, G.O. (1975a)
Beziehungen zwischen Mannitkonzentration und osmotischer Belastung bei der Brackwasseralge *Platymonas subcordiformis*.
Z. Pflanzenphysiol. **76**, 316-325
- KIRST, G.O. (1975b)
Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen von NaCl und anderen osmotisch wirksamen Substanzen auf die CO₂-Fixierung der einzelligen Alge *Platymonas subcordiformis*.
Oecologia **20**, 237-254
- KIRST, G.O. (1977a)
The cell volume of the unicellular alga, *Platymonas subcordiformis* : Effect of the salinity of the culture media and of osmotic stresses.
Z. Pflanzenphysiol. **81**, 386-394
- KIRST, G.O. (1977b)
Coordination of ionic relations and mannitol concentrations in the euryhaline unicellular alga *Platymonas subcordiformis* after osmotic shocks.
Planta **135**, 69-75
- KIRST, G.O. (1977c)
Ion composition of unicellular marine and freshwater algae, with special reference to *Platymonas subcordiformis* cultivated in Media with different osmotic strengths.
Oecologia **28**, 177-189
- KIRST, G.O. (1981)
Photosynthesis and respiration of *Griffithsia monilis* (Rhodophyceae): Effect of light, salinity and oxygen.
Planta **151**, 281-288
- KIRST, G.O. (1985)
Osmotische Adaptation bei Algen.
Naturwissenschaften **72**, 125-132
- KIRST, G.O. (1990)
Salinity tolerance of eukaryotic marine algae.
Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **41**, 21-53

- KIRST, G.O. & BISSON, M.A. (1979)
Regulation of turgor pressure in marine algae:
Ions and low-molecular-weight organic compounds.
Aust. J. Plant Physiol. **6**, 539-556
- KIRST, G.O. & KELLER, H.J. (1976)
Der Einfluß unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen auf die Atmung
der einzelligen Alge *Platymonas subcordiformis*.
Bot. Mar. **19/4**, 241-244
- KIRST, G.O. & KRAMER, D. (1981)
Cytological evidence for cytoplasmic volume control
in *Platymonas subcordiformis* after osmotic stress.
Plant, Cell and Environment **4**, 455-462
- KLOAREG, B. & QUATRANO, R.S. (1988)
Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions
of the matrix polysaccharides.
Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. **26**, 259-315
- KNEBEL, G. (1936)
Monographie der Algenreihe der Prasiolales, insbesondere von *Prasiola crispa*.
Hedwigia **75**, 1-120
- KNIGHT, D.P. (1977)
Cytological staining methods in electron microscopy.
in Lewis, P.R. & Knight, D.P. (eds.): Staining methods for sectioned material.
Practical methods in electron microscopy 5/1 pp 25 f,
Elsevier North-Holland Biomedical Press
- KNOTH, A. & WIENCKE, C. (1984)
Dynamic changes of protoplasmatic volume and of fine structure during
osmotic adaptation in the intertidal red alga *Porphyra umbilicalis*.
Plant, Cell and Environment **7**, 113-119
- LANGE, B. & VEJDELEK, Z.J. (1980)
Photometrische Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim
- LANGE, O.L. & KILIAN, E. (1985)
Reaktivierung der Photosynthese trockener Flechten durch Wasserdampfaufnahme
aus dem Luftraum: Artsspezifisch unterschiedliches Verhalten.
Flora **176**, 7-23
- LANGE, O.L.; BILGNER, W.; RIMKE, S.; SCHREIBER, U. (1989)
Chlorophyll fluorescence of lichens containing green and blue-green algae
during hydration by water vapor uptake and by addition of liquid water.
Botanica Acta **102**, 306-313
- LANGE, O.L.; PFANZ, H.; KILIAN, E.; MEYER, A. (1990)
Effect of low water potential on photosynthesis in intact lichens
and their liberated algal components.
Planta **182**, 467-472

LEHMANN, H.; KRAMER, A.; SCHULZ, D.; PROBST, W. (1990)
Preparation of plant material for elemental analysis using ESI and EELS techniques.
Ultramicroscopy 32, 26-34

LEHMANN, H.; KUNZ, U.; JACOB, A. (1991)
A simplified preparation procedure of plant material for elemental analysis
by ESI and EELS techniques.
J. Microsc. 161/1, 77-82

LINDEBOOM, H.J. (1979)
Chemical and microbiological aspects of the nitrogen cycle
on Marion Island (Sub Antarctic).
Dissertation an der Rijksuniversiteit Groningen, Niederlande

LIU, M.S. & HELLEBUST, J.A. (1976a)
Effects of salinity and osmolarity of the medium on amino acid metabolism
in *Cyclotella cryptica*.
Can. J. Bot. 54/9, 938-948

LIU, M.S. & HELLEBUST, J.A. (1976b)
Regulation of proline metabolism in the marine centric diatom *Cyclotella cryptica*.
Can. J. Bot. 54/9, 949-959

LIU, M.S. & HELLEBUST, J.A. (1976c)
Effects of salinity changes on growth and metabolism
of the marine centric diatom *Cyclotella cryptica*.
Can. J. Bot. 54, 930-937

LÜNING, K. (1985)
Meeresbotanik.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

McFADDEN, G.I. & MELKONIAN, M. (1986)
Use of Hepes buffer for microalgal culture media and fixation
for electron microscopy.
Phycologia 25/4, 551-557

McLACHLAN, J. (1961)
The effect of salinity on growth and chlorophyll content
in representative classes of unicellular marine algae.
Can. J. Microbiol. 7, 399-406

McLACHLAN, J. (1973)
Growth media - marine.
In: Stein, J.R.(ed.): Handbook of Phycological methods.
Cambridge University Press, pp 25-52

METZNER, H. (1982)
Pflanzenphysiologische Versuche.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp 242-244

MUNNS, R.; GREENWAY, H.; SETTER, T.L.; KUO, J. (1983)
Turgor pressure, volumetric elastic modulus, osmotic volume and ultrastructure
of *Chlorella emersonii* grown at high and low external NaCl.
J. Exp. Bot. 34/139, 144-155

- NOAILLES, M.-C. (1978)
Etude ultrastructurale de la récupération hydrique après une période de sécheresse chez une hypnobryale: *Pleurozium schreberi* (WILLD.) MITT.
Ann. Sci. Naturelles, Bot. 12/19, 249-265
- OGATA, E. & TAKADA, H. (1955)
Elongation and shrinkage in thallus of *Porphyra tenera* and *Ulva pertusa* caused by osmotic changes.
Osaka Univ. Polytech. J. D6, 29-40
- OKAZAKI, Y.; YOSHIMOTO, Y.; HIRAMOTO, Y.; TAZAWA, M. (1987a)
Turgor regulation and cytoplasmic free Ca²⁺ in the alga *Lamprothamnium*.
Protoplasma 140, 67-71
- OKAZAKI, Y.; SAKANO, K.; TAZAWA, M. (1987b)
Turgor regulation in a brackish water charophyte, *Lamprothamnium succinctum* III. Changes in cytoplasmic amino acids and sucrose contents during turgor regulation.
Plant Cell Physiol. 28/4, 663-669
- OTTENSMEYER, F.P. & ANDREW, J.W. (1980)
High-resolution microanalysis of biological specimens by electron energy loss spectroscopy and by electron spectroscopic imaging.
J. ultrastruc. Res. 72, 336-348
- PANKOW, H.; HAENDEL, D.; RICHTER, W.; WAND, U. (1987)
Algologische Beobachtungen in der Schirmacher- und Unterseeoase (Dronning-Maud-Land, Ostantarctica).
Arch. Protistenkd. 134, 59-82
- PLATTNER, H. & ZINGSHEIM, H.-P. (1987)
Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp 38 f
- POST, A. (1990)
Photoprotective pigment as adaptive strategy in the antarctic moss *Ceratodon purpureus*.
Polar Biol. 10, 241-245
- QUADIR, A.; HARRISON, P.J.; DeWREEDE, R.E. (1979)
The effects of emergence and submergence on the photosynthesis and respiration of marine macrophytes.
Phycologia 18/1, 83-88
- REED, R.H. (1983)
The osmotic responses of *Polysiphonia lanosa* (L.) Tandy from marine and estuarine sites: Evidence for incomplete recovery of turgor.
J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 68, 169-193
- REED, R.H. (1985)
Osmoacclimation in *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta, Bangiales): the osmotic role of floridoside.
Br. phycol. J. 20, 211-218

- REED, R.H. (1990)
Solute accumulation and osmotic adjustment.
In: Cole, K.M. & Sheath, R.G. (eds.) : Biology of red algae
Cambridge University Press, 147-170
- REED, R.H.; COLLINS, J.C.; RUSSELL, G. (1980)
The effects of salinity upon cellular volume of the red alga
Porphyra purpurea (Roth)C.Ag.
J. Exp. Bot. 31/125, 1521-1537
- REED, R.H.; COLLINS, J.C.; RUSSELL, G. (1981)
The effects of salinity upon ion content and ion transport
of the marine red alga *Porphyra purpurea* (Roth)C.Ag.
J. Exp. Bot. 32/127, 347-367
- REYNOLDS, E.S. (1963)
The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.
J. Cell Biol. 17, 209-211
- RICHTER, G. (1988)
Stoffwechselphysiologie der Pflanzen.
Thieme Verlag Stuttgart, 5. Aufl. pp 430 f
- RITCHIE, R.J. (1988)
The ionic relations of *Ulva lactuca*.
J. Plant Physiol. 133, 183-192
- RITCHIE, R.J.. & LARKUM, A.W.D. (1982a)
Cation exchange properties of the cell walls of
Enteromorpha intestinalis (L.) Link. (Ulvales, Chlorophyta)
J. Exp. Bot. 33/132, 125-139
- RITCHIE, R.J. & LARKUM, A.W.D. (1982b)
Ion exchange fluxes of the cell walls of
Enteromorpha intestinalis (L.) Link (Ulvales, Chlorophyta).
J. Exp. Bot. 33/132, 140-153
- SATOH, K.; SMITH, C.M.; FORK, D.C. (1983)
Effects of salinity on primary processes of photosynthesis
in the red alga *Prophyra perforata*.
Plant Physiol. 73, 643-647
- SCHOBERT, B. (1977)
Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants?
J. Theor. Biol. 68, 17-26
- SCHOBERT, B. (1980)
Proline catabolism, relaxation of osmotic strain and
membrane permeability in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*.
Physiol. Plant. 50, 37-42
- SCHOFIELD, E. & AHMADJIAN, V. (1972)
Field observations and laboratory studies of some antarctic cold desert cryptogams.
Antarctic Research Studies 20, 97-142

- SITTE, P. (1962)
Ein einfaches Verfahren zur Gewebeeentwässerung.
Naturwissenschaften **49/17**, 402-403
- SITTE, P. (1991)
Die Zelle in der Evolution des Lebens.
BiuZ **21/2**, 85-92
- SMITH, C.M.; SATOH, K.; FORK, D.C. (1986)
The effects of osmotic tissue dehydration and air drying
in morphology and energy transfer in two species of *Porphyra*.
Plant Physiol. **80**, 843-847
- SPIES, J.R. (1957)
Colorimetric procedures for amino acids.
In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. (eds.): Methods in Enzymology, **3** Academic
Press, New York, pp 468-471
- SPURR, A.R. (1969)
A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.
J. Ultrastruct. Res. **26**, 31-43
- TAIT, R.V. (1971)
Meeresökologie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart, pp 73 f.
- THOMAS, E.A. & TREGUNNA, E.B. (1970)
Studies on HCO₃⁻ ion uptake during photosynthesis in benthic marine algae.
Phycologia **9**, 293-303
- TREZZI, F.; GALLI, M.G.; BELLINI, E. (1965)
L'osmo-resistenza di *Dunaliella salina* ricerche ultrastrutturali.
G. Bot. Ital. **72**, 255-263
- TRUESDALE, G.A.; DOWNING, A.L.; LOWDEN, G.F. (1955)
The solubility of oxygen in pure water and sea-water.
J. appl. Chem. **5**, 53-62
- WAGNER, H.P. & ZANEVELD, J.S. (1988)
The Xanthophyceae and Chlorophyceae of the Western Ross Sea, Victoria Land,
Antarctica and Macquarie Island collected under the direction of
Prof. Dr. J.S. Zaneveld (1963-1967).
Blumea **33**, 141-180
- WEST, K.R. & PITMAN, M.G. (1967)
Ionic relations and ultrastructure in *Ulva lactuca*.
Aust. J. biol. Sci. **20**, 901-914
- WIENCKE, C. & DAVENPORT, J. (1987)
Respiration and photosynthesis in the intertidal alga *Cladophora rupestris* (L.) Kütz.
under fluctuating salinity regimes.
J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **114**, 183-197

- WIENCKE, C. & tom DIECK, I. (1990)
Temperature requirements for growth and survival of macroalgae from Antarctica and southern Chile.
Mar. Ecol. Prog. Ser. **59**, 157-170
- WIENCKE, C. & FISCHER, G. (1990)
Growth and stable carbon isotope composition of cold-water macroalgae in relation to light and temperature.
Mar. Ecol. Prog. Ser. **65**, 283-292
- WIENCKE, C. & LÄUCHLI, A. (1980)
Growth, cell volume, and fine structure of *Porphyra umbilicalis* in relation to osmotic tolerance.
Planta **150**, 303-311
- WIENCKE, C. & LÄUCHLI, A. (1981)
Inorganic ions and floridoside as osmotic solutes in *Porphyra umbilicalis*.
Z. Pflanzenphysiol. **103**, 247-258
- WIENCKE, C. & LÄUCHLI, A. (1983)
Tonoplast fine structure and osmotic regulation in *Porphyra umbilicalis*.
Planta **159**, 342-346
- WIENCKE, C.; STELZER, R.; LÄUCHLI, A. (1983)
Ion compartmentation in *Porphyra umbilicalis* determined by electron-probe X-ray microanalysis.
Planta **159**, 336-341
- WIENCKE, C.; KNOTH, A.; STELZER, R. (1984)
Changes of protoplasmatic and vacuolar volume during osmotic adaptation and ion compartmentation in *Porphyra umbilicalis*.
Hydrobiologica **116/117**, 481-484
- WILTENS, J.; SCHREIBER, U.; VIDAVER, W. (1978)
Chlorophyll fluorescence induction: an indicator of photosynthetic activity in marine algae undergoing desiccation.
Can. J. Bot. **56**, 2787-2794
- WRIGHT, P.J.; CHUDEK, J.A.; FOSTER, R.; REED, R.H. (1989)
Turnover of the intracellular mannitol pool of *Fucus spiralis* L. (Fucales, Phaeophyta) during osmotic shock.
J. Exp. Bot. **40/221**, 1347-1353
- YANCEY, P.H.; CLARC, M.E.; HAND, S.C.; BOWLUS, R.D.; SOMERO, G.N. (1982)
Living with water stress: Evolution of osmolyte systems.
Science **217**, 1214-1222
- YOUNG, A.J.; COLLINS, J.C.; RUSSELL, G. (1987a)
Solute regulation in the euryhaline marine alga *Enteromorpha prolifera*.
J. Exp. Bot. **38/193**, 1298-1308
- YOUNG, A.J.; COLLINS, J.C.; RUSSELL, G. (1987b)
Ecotypic variation in the osmotic responses of *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link.
J. Exp. Bot. **38/193**, 1309-1324

ZIMMERMANN, U. (1978)
Physics of turgor- and osmoregulation.
Annu. Rev. Plant Physiol. **29**, 121-148

ZMIRI, A. & GINZBURG, B.-Z. (1983)
Extracellular space and cellular sodium content in pellets
of *Dunaliella parva* (Dead Sea, 75).
Plant Science Letters **30**, 211-218

Danksagungen

Ich danke Professor Dr. G. O. Kirst (Bremen) für die Betreuung dieser Arbeit, die er durch vielfache Anregungen und seine ständige Diskussionsbereitschaft sehr unterstützt hat. Insbesondere möchte ich ihm danken für das große Vertrauen, mich als "unbekannten Auswärtigen" in seine Arbeitsgruppe aufzunehmen und mit diesem Forschungsprojekt zu betrauen.

In seiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich bei Frau Dr. U. Winter, Dr. U. Karsten, sowie den Dipl. Biol. J. Nothnagel und M. Wanzek für ihre Hilfsbereitschaft bei der Vorbereitung und Durchführung vieler Analysen. Ein besonderer Dank geht an Frau R. Ulmke für die unermüdliche Hilfestellung bei der Bewältigung organisatorischer Schwierigkeiten.

Professor Dr. H. Lehmann (Hannover) hat mich in die Elektronenmikroskopie eingeführt und war mir ein ständiger Ansprechpartner in Hannover. Für die langjährige Unterstützung und Förderung möchte ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken.

Frau U. Kunz hat mir durch ihre ausgezeichnete technische Assistenz bei der Elektronenmikroskopie sehr geholfen. Mein weiterer Dank gilt Prof. Dr. G. Schultz, Priv. Doz. Dr. habil. B. Huchzermeyer und besonders Dipl. Biochem. A. Heintze für die Beratung bei Problemen mit der Biochemie.

Großen Dank schulde ich PD Dr. habil. C. Wiencke (Bremerhaven) für die Überlassung der Kulturen von *Prasiola crista* und für seine Initiative, die wesentlich zur Entstehung dieses Forschungsvorhabens beigetragen hat. Auch verdanke ich ihm viele Hilfen, insbesondere bei der Einarbeitung in das neue Fachgebiet.

Dr. D. N. Thomas und Frau C. Langreder danke ich für die Herstellung und den Transport von etlichen Hektolitern Meerwasser-Medium. Ein weiterer Dank geht an das Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung für die Aufnahme dieser Dissertation in die Reihe der "Berichte zur Polarforschung".

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. A. Schmidt (Hannover) für seine Unterstützung bei der Erstellung der Druckvorlage für diese Arbeit, sowie all denen, die hier nicht genannt wurden, und die doch diese Arbeit maßgeblich unterstützt haben.

Diese Arbeit entstand im Rahmen des DFG-Forschungsvorhabens "Prasiola", das von folgenden Instituten getragen wurde:

- * Abteilung Meeresbotanik, Universität Bremen, FB2
(Prof. Dr. G. O. Kirst)
- * Botanisches Institut der Tierärztlichen Hochschule, Hannover
(Prof. Dr. H. Lehmann)
- * Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven
(PD Dr. habil. C. Wiencke)

Mein abschließender Dank gilt daher der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die durch die Bewilligung der erforderlichen Mittel an Herrn Prof. Kirst das Forschungsvorhaben "Prasiola" ermöglicht hat.

Hannover, im September 1991

A.J.

Anhang 1

Rezepte für den Methodenteil

1. Kulturmedien

Spurenelement- und Vitaminlösungen
(nach Provasoli: McLACHLAN, 1973)

PII:

Na ₂ MoO ₄	5,2 μM	377,4 mg
ZnCl ₂	0,8 μM	32,7 mg
MnCl	7,3 μM	433,4 mg
CoCl ₂	0,2 μM	12,2 mg
Fe-EDTA	1,8 μM	198,2 mg
EDTA	25,0 μM	2791,8 mg

aqua bidest. ad 100ml, ergibt Stammlösung 1:3000

SII:

NaBr	125,0 μM	3858,8 mg
LiCl	28,8 μM	366,2 mg
SrCl	23,0 μM	1839,7 mg
RbCl	2,3 μM	83,4 mg
KJ	0,08 μM	4,0 mg

aqua bidest. ad 100 ml, ergibt Stammlösung 1:3000

Vitaminlösung:

Cyanobalamin	0,2 μg/l	60 μg
Biotin	1,0 μg/l	300 μg
Thiamin-HCl	100,0 μg/l	30 mg

aqua bidest. ad 100 ml, ergibt Stammlösung 1:3000

Die fertigen Stammlösungen wurden in 1ml-Eppendorff-Reaktionsgefäße pipettiert und bis zum Gebrauch (1ml Stammlösung auf 3 Liter Kulturmedium) eingefroren.

2. Ionenanalysen

NH_4^+ - Bestimmung mit Neßler's Reagenz (LANGE & VEJDELEK, 1980)

Puffer: 50 g K-Na-Tartrat
 5 ml Neßler's Reagenz (s.u.)
 100 ml aqua bidest
 einige Tage stehenlassen, dann filtrieren

Reagenz Neßler's Reagenz (handelsfertig)

Ansatz: 0,5 ml Probe*
 0,1 ml Puffer
 0,2 ml Reagenz
 4,5 ml aqua bidest
 messen nach 1 Stunde bei 430 nm gegen H_2O

Eichung 0,1 - 2 mM NH_4Cl

* HNO_3 in der Probe zerstört die Färbung, Extraktion mit HCl führt zur Abspaltung von NH_4^+ aus Glutamin und Asparagin.

Cl^- - Bestimmung mit dem Chloridtitrator

Reagenz: 12,8 ml konz. HNO_3
 200 ml Eisessig
 aqua bidest ad 1000 ml

Ansatz: 2 ml Probe
 2 ml Reagenz
 3 Tropfen 0,6% wässr. Gelatinelösung (warm)

Eichung: 0,5 mM NaCl , nach Anweisung des Geräteherstellers

NO_3^- - Bestimmung mit Chromotropsäure (LANGE & VEJDELEK, 1980)

Reagenz: 0,4% Chromotropsäure in konz. H_2SO_4

Ansatz : 3,0 ml Probe*
 5,0 ml konz. H_2SO_4 unter Eiskühlung zugeben
 1,0 ml Reagenz
 15 Minuten auf 60°C erwärmen, dann abkühlen,
 messen bei Raumtemperatur und 410 nm
 gegen Blindprobe ohne Reagenz

Eichung: 0,1 - 2 mM NaNO_3

* HCl in der Probe zerstört die Färbung

**NO₃⁻ - Bestimmung mit Brucinsulfat
(LANGE & VEJDELEK, 1980)**

Reagenz: 321 mg Brucinsulfat (*7H₂O)
25 ml aqua bidest

Ansatz: 1 ml Probe*
150 µl Reagenz
2 ml konz. H₂SO₄
40 Minuten bei 60°C inkubieren,
20 Minuten abkühlen, messen bei 405 nm gegen H₂O

Eichung: 10 - 200 µM NaNO₃

* HCl in der Probe zerstört die Färbung

**SO₄²⁻ - Bestimmung durch Trübungsmessung
(JACKSON & McCANDLESS, 1978)**

Reagenz a: 15 mg Agarose
500 mg BaCl₂
100 ml aqua bidest

Reagenz b: 15 mg Agarose
100 ml aqua bidest

Ansatz: 1,1 ml Probe
1,2 ml 8% wässr. TCA (Trichloressigsäure)
0,6 ml Reagenz
mischen und 40 Minuten stehen lassen,
dann aufschütteln und Trübung bei 500 nm messen.
Gemessen werden jeweils zwei Parallelansätze,
wobei der Ansatz mit Reagenz b den Blindwert für
den Ansatz mit Reagenz a ergibt.

Eichung: 0,25 - 10 mM Na₂SO₄

PO_4^{3-} - Bestimmung mit Vanadat
(LANGE & VEJDELEK, 1980)

Lösung a: 250 mg Ammoniumvanadat
 in 50 ml heißem aqua bidest lösen, abkühlen
 2 ml konz. HNO_3 dazugeben
 aqua bidest ad 100 ml

Lösung b: 10 g Ammoniummolybdat
 in 50 ml heißem aqua bidest lösen, abkühlen
 10 ml konz. H_2SO_4 dazugeben, abkühlen
 aqua bidest ad 100 ml

Reagenz: gleiche Volumina von Lösung a + b
 kurz vor Gebrauch mischen

Ansatz: 100 μl Probe
 100 μl 10% wässr. TCA (Trichloressigsäure)
 1 ml 10% wässr. H_2SO_4
 1 ml Reagenz
 messen bei 410 nm gegen H_2O

Eichung: 0,5 - 10 mM KH_2PO_4

3. sonstige Inhaltsstoffe

Chlorophyllbestimmung mit Dimethylformamid (INSKEEP & BLOOM, 1985)

Die frischen Thalli wurden in einem verschraubbaren Glasröhrchen mit einem bekannten Volumen N,N-Dimethylformamid bei 4 °C extrahiert. Die Proben wurden abgedunkelt und evtl. auf einen Schüttler gestellt. Nach 1-3 Tagen waren die Thalli vollständig entfärbt. Die so gewonnene Chlorophyll-Lösung zeigte über einen Zeitraum von 100 Tagen (!) eine stabile Extinktion bei 647 nm und bei 664,5 nm. Die Chlorophyllgehalte der Extrakte berechnen sich nach den folgenden Gleichungen:

$$\begin{aligned} \text{Chlorophyll a:} & \quad (12,7 * E_{664,5}) - (2,79 * E_{647}) \quad \text{in mg/l} \\ \text{Chlorophyll b:} & \quad (20,7 * E_{647}) - (4,62 * E_{664,5}) \quad \text{in mg/l} \\ \text{gesamt Chl.} & \quad : (17,9 * E_{647}) + (8,08 * E_{664,5}) \quad \text{in mg/l} \end{aligned}$$

Bestimmung von Aminosäuren mit Ninhydrin (SPIES, 1957)

- Lösung a: 2,1 g Na-Citrat
 in 20 ml 1 N NaOH lösen,
 aqua bidest ad 50 ml
 80 mg SnCl₂ (*2H₂O)
- Lösung b: 2 g Ninhydrin
 50 ml 2-Methoxy-ethanol
 (= Methylglycol, = Methyl-Cellosolve)
 (= Äthylenglycol-monomethyläther)
- Reagenz: gleiche Teile von Lösung a und b,
 nur wenige Tage haltbar
- Ansatz: 100 µl Probe*
 1 ml Reagenz
 20 Minuten bei 100 °C im Wasserbad
 5 ml 50% wässr. n-Propanol
 messen nach 15 - 60 Minuten bei 440 nm
 und 570 nm gegen Blindwert ohne Probe
- Eichung: 0,25 - 2 mM, separate Eichreihen für
 NH₄⁺, Leucin, Asparagin, Glutaminsäure;
 0,25 - 10 mM Prolin

* Die Proben dürfen nicht mit HCl extrahiert werden, da sonst die Aminogruppen von proteingebundenem Glutamin und Asparagin abgespalten und mitgemessen werden.

Die Messung bei 570 nm erfasst die Aminosäuren ohne Prolin und Hydroxyprolin. Bei 440 nm werden alle Aminosäuren gemessen. NH₄⁺ wird bei beiden Messungen ebenfalls nachgewiesen. Die leicht unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Aminosäuren liegen im Bereich von ± 10% und damit innerhalb der allgemeinen Meßgenauigkeit.

4. Messung der Photosynthese in der Gasphase (METZNER, 1982)

Indikatorlösung: 8,4 mg NaHCO_3
738,1 mg KCl
100 μl 1% wässr. Kresolrotlösung
aqua bidest ad 100 ml

Der Meßbereich liegt bei 4°C zwischen
3,5 mg CO_2 / l Gas (Indikatorfarbe gelb) und
0,2 mg CO_2 / l Gas (Indikatorfarbe violett)

5. Rezepte für die Elektronenmikroskopie

Einbettung in Spurr's Medium
(SPURR, 1969)

	normal	fest	hart	dünn*
ERL-4206	10	10	10	10
DER 736	6	5	4	6
NSA	26	26	26	26
DMAE	0,4	0,4	0,4	0,2

alle Angaben in g

* dünnflüssige Variante, doppelte Polymerisationsdauer

ERL-4206 = Vinylcyclohexendioxid
DER 736 = Polypropylenglykol-Diglycidyläther
NSA = Nonenyl-Bernsteinsäureanhydrid
DMAE = Dimethylaminoäthanol

Nachkontrastierung mit Bleicitrat
(nach REYNOLDS, 1963; verändert)

Lösung a: 31,25 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$
500 ml aqua bidest
10 Tropfen konz. HNO_3

Lösung b: 41,5 g Na-Citrat (tri Natrium-Citrat *2 H_2O)
500 ml aqua bidest
5 Tropfen von Lösung a

Reagenz: 2,1 ml Lösung a
2,1 ml Lösung b
zusammengenommen und schütteln (Niederschlag)
0,8 ml 1 N NaOH
dazugeben, Lösung wird klar.
Sofort verbrauchen, vor CO_2 schützen!

Anhang 2

Liste der Verbrauchsmaterialien:

aqua bidest. aus Milli Q - Anlage	Millipore
Araldit (Durcupan ACM) A/M, B, C, D	Fluka
Auramine O	Sigma
EDTA (Aethylendinitrilo- tetraessigsäure Na-Salz)	Fluka
Enzymtest für Glucose / Saccharose Sorbit Stärke	Boehringer Nr. 139 041 670 057 207 748
Extraktionsmittel Aethanol 100% p.A. DMF (N,N-Dimethylformamid) p.A. HCl 32% p.A. HNO ₃ 65% p.A.	Merck Fluka Merck Fluka
Filmmaterial für Lichtmikroskopie Elektronenmikroskopie	Agfapan 25 Guilleminot E18
Filter für die Belüftung Selektron, 0,2 µm	Schleicher & Schüll
Formaldehyd	Merck
Glutar(di)aldehyd 25% wässrig	Serva
Goldobjektträger für Gefrierätzung	Balzers, Lichtenstein
Hepes-Puffer (N-[2-Hydroxyäthyl]piperazin N'-[äthansulfonsäure) Na-Salz	Sigma
Kunststoff-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Kupfergrids (-Netze)	Hert GmbH

MES-Puffer (2-[N-Morpholino] aethansulfonsäure) Na-Salz	Sigma
Nanoplast FB 101	Plano, Plannet GmbH
NaCl, Rotipuran >99,9%	Roth
Neonröhren L36W11	Osram
Osmiumtetroxid	Hert GmbH
Pektinase und Pektinesterase	Sigma
Photopapier	Agfa, Brovira-Speed
Pioloform F	Hert GmbH
Schnelltest für NO ₃ -Bestimmung O ₂ -Bestimmung	Macherey - Nagel, Visocolor 914 031 915 009
SO ₄ -Bestimmung	Merck, Aquaquant 14411
Spurr's Medium ERL-4206, NSA, DMAE, D.E.R.736	Serva
Tafelglas für Glasmesser	LKB Produkter, Schweden

Alle Chemikalien, die in dieser Liste nicht aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck, Fluka oder Serva geliefert. Der Reinheitsgrad war p.A. oder reinst.

Anhang 3

Tabellen zu den Grafiken

Alle Angaben als Mittelwert \pm Standardabweichung und Umfang (n)
wenn nicht anders beschrieben

Grafik 1: Wachsraten unter hypoosmotischem Streß

Salinität in ‰	Salzstreß WR in %	Nachkultur WR in %	WR in % bez. org. Tr.
0,35	106 \pm 18 (10)	58 \pm 13 (5)	107*
3,5	111 \pm 17 (5)	88 \pm 21 (5)	
7	115 \pm 18 (5)	116 \pm 25 (5)	
17	140 \pm 24 (10)	87 \pm 7 (5)	127*
26	105 \pm 18 (5)	80 \pm 11 (5)	
35	100 \pm 5 (14)	100 \pm 5 (14)	100*

* in der Grafik nicht dargestellt

Grafik 2: Wachsraten unter hyperosmotischem Streß

Salinität in ‰	Salzstreß WR in %	Nachkultur WR in %	WR in % bez. org. Tr.
35	100 \pm 5 (14)	100 \pm 5 (14)	100*
70	18 \pm 14 (9)	109 \pm 11 (5)	40*
105	5 \pm 3 (5)	114 \pm 16 (5)	
175	-9 \pm 8 (9)	114 \pm 23 (5)	15*
210	-11 \pm 2 (5)	74 \pm 13 (5)	

* in der Grafik nicht dargestellt

Grafik 3: Gewichtsanteile des Thallus

Salinität in ‰	Wasser in % Fg	Ionen* in % Fg	org. Tr. in % Fg
0,35	74 \pm 3 (22)	1	25
17	75 \pm 3 (23)	3	22
35	71 \pm 3 (25)	4	25
70	61 \pm 4 (17)	9	30
175	55 \pm 4 (21)	14	31

*Der überwiegende Teil der Ionen ist im ECS lokalisiert

Grafik 4: Kationengehalte unter versch. Salinitäten

Salinität in ‰	Na ⁺ in μmol/g Fg	K ⁺ in μmol/g Fg	NH ₄ ⁺ in μmol/g Fg
0,35	8 ± 7 (16)	65 ± 12 (25)	12 ± 2 (3)
17	20 ± 9 (17)	84 ± 19 (23)	10 ± 0 (4)
35	21 ± 8 (27)	88 ± 23 (36)	10 ± 3 (4)
70	105 ± 39 (9)	266 ± 87 (9)	16 ± 0 (3)
175	52 ± 13 (15)	102 ± 25 (25)	33 ± 4 (3)

Salinität in ‰	Mg ²⁺ in μmol/g Fg	Ca ²⁺ in μmol/g Fg
0,35	23 ± 5 (8)	1*
17	25 ± 5 (9)	1*
35	25 ± 7 (10)	1*
70	25 ± 16 (7)	1*
175	24 ± 5 (7)	1*

* die Ca²⁺ -Gehalte lagen an der unteren Nachweisgrenze,
sie sind in der Grafik nicht dargestellt

Grafik 5: Anionengehalte unter versch. Salinitäten

Salinität in ‰	Cl ⁻ in μmol/g Fg	PO ₄ ³⁻ in μmol/g Fg
0,35	2 ± 1 (3)	142 ± 32 (9)
17	2 ± 0 (4)	116 ± 22 (11)
35	4 ± 1 (6)	107 ± 13 (10)
70	7 ± 3 (6)	218 ± 84 (8)
175	15 ± 8 (6)	96 ± 26 (13)

SO₄²⁻ an der Nachweisgrenze von ca. 1 μmol/g Fg,
mit dem Schnelltest nicht nachweisbar

NO₃⁻ unter der Nachweisgrenze von ca. 1 μmol/g Fg

beide Ionen sind in Grafik 5 nicht dargestellt

Grafik 6: Ionenaufnahme in 70‰

Zeit in Tagen	Na ⁺ in $\mu\text{mol/g Fg}$	K ⁺ in $\mu\text{mol/g Fg}$	PO ₄ ³⁻ in $\mu\text{mol/g Fg}$
0	21	88	107
0,5	61	90	63
1	73	76	106
2	85	86	124
3	86	98	164
6	85	125	166
14	105	266	218

SD = ca. 10% der o.a. Mittelwerte
(n) für alle Proben = 3

Grafik 7: Ionenkonzentrationen in ECS und Medium

Salinität in ‰	Na ⁺ Medium	Na ⁺ ECS	K ⁺ Medium	K ⁺ ECS
0,35	5	32	0,1	72
17	240	260	5	138
35	480	472	10	134
70	960	800	20	0
175	2402	2210	48	190

alle Angaben in $\mu\text{mol/ml}$ bzw. mol/m^3
SD der ECS-Werte ca. 10% vom Mittelwert,
(n) für alle Proben ≥ 4

Grafik 8: Konzentrationsquotient zwischen ECS und Medium

Salinität in ‰	Na ⁺ ECS/Medium	K ⁺ ECS/Medium
0,35	6,4	720,0
17	1,1	27,6
35	1,0	13,4
70	0,8	0,0
175	0,9	4,0

Grafik 9: Gehalte organischer Osmotika

Salinität in ‰	Sorbit in $\mu\text{mol/g Fg}$	Saccharose in $\mu\text{mol/g Fg}$	Glukose in $\mu\text{mol/g Fg}$
0,35	14 ± 3 (3)	2 ± 0 (3)	0,6 ± 0,4 (4)
17	44 ± 4 (3)	6 ± 1 (3)	1,0 ± 0,3 (4)
35	76 ± 4 (3)	9 ± 2 (3)	1,1 ± 0,1 (3)
70	60 ± 10 (6)	13 ± 3 (3)	8,7 ± 0,9 (6)
175	119 ± 9 (3)	35 ± 15 (3)	0,9 ± 0,4 (6)

Salinität in ‰	Aminosäuren* in $\mu\text{mol/g Fg}$	Prolin in $\mu\text{mol/g Fg}$
0,35	63 ± 8 (7)	33 ± 3 (4)
17	73 ± 11 (9)	69 ± 8 (5)
35	55 ± 7 (8)	69 ± 5 (4)
70	54 ± 9 (7)	34 ± 3 (5)
175	76 ± 7 (5)	37 ± 3 (4)

* Aminosäuren ohne Prolin,
Eichung mit Leucin, Asparagin, Glutaminsäure

Grafik 10: Osmotische Potentiale

Salinität in ‰	Medium *	P r o t o p l a s t		
		Kationen	Anionen	org. Osmotika
0,35	0,025	0,218	0,290	0,226
17	0,502	0,280	0,238	0,386
35	0,990	0,290	0,224	0,420
70	2,045	0,826	0,452	0,340
175	ca. 4	0,424	0,224	0,536

* Die Osmolarität des Mediums wurde aus
den Meßwerten in osmol/kg umgerechnet.

alle Angaben in mosmol/ml bzw. osmol/l

Grafik 11: Chlorophyllgehalte

Salinität in ‰	gesamt Chl. mg/g Fg	Chl a mg/g Fg	Chl b mg/g Fg	ges. Chl mg/g Tr	Chl.- Synt.*
0,35	2,2 ± 0,6 (3)	1,7	0,5	7,6	4,3
17	2,1 ± 0,3 (3)	1,7	0,4	9,2	6,4
35	1,9 ± 0,5 (8)	1,5	0,4	9,3	3,2
70	4,0 ± 0,4 (4)	3,0	1,0	10,3	2,9
175	3,5 ± 0,5 (4)	2,6	0,9	7,6	1,3

* Werte aus der Modellrechnung (siehe Text) in
mg neusynthetisiertes Chlorophyll / g Fg_{Anfang}

Grafik 12: Photosynthese und Atmung

Salinität in ‰	O ₂ -Produktion bei 10 μE/m ² s	O ₂ -Produktion bei 300μE/m ² s	O ₂ -Umsatz bei Atmung	(n)
0,35	0,84 ± 0,36	4,57 ± 1,49	-0,67 ± 0,13	(7)
17	1,24 ± 0,37	6,65 ± 1,22	-1,51 ± 1,32	(6)
35	0,94 ± 0,27	5,34 ± 0,96	-0,92 ± 0,65	(6)
70	0,24 ± 0,10	0,60 ± 0,14	-0,21 ± 0,05	(3)
175	0	0	0	(5)

alle Angaben in mg O₂ / g Fg h
negative Werte = O₂-Verbrauch

Grafik 13: Photosynthese - Lichtkurven

Salinität in ‰	O ₂ - P r o d u k t i o n b e i				
	0	10	100	200	300
0,35	0	0,84	3,45	4,40	4,57
17	0	1,24	5,30	6,47	6,65
35	0	0,94	4,10	5,25	5,34
70	0	0,24	0,41	0,55	0,60
175	0	0	0	0	0

alle Angaben in mg O₂ / g Fg h
Für SD und (n) siehe Tabelle zu Grafik 12

Grafik 14: Photosynthese und Atmung nach Upshock

Zeit in Stunden	Atmung bei 0 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$	Photosynthese bei 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$
a*	0,9 \pm 0,7	5,3 \pm 1,0
0	0,2	0,1
2	0,1	0,1
8	0,1	0,4
b*	0,0	0,0

* a: Normalwerte in 35‰

b: Werte nach 14 Tagen in 175‰

alle Angaben als O_2 -Umsatz in mg O_2 / g Fg h

Grafik 15: Photosynthese und Atmung nach Downshock

Zeit in Stunden	Atmung bei 0 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$	Photosynthese bei 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$
b*	0,0	0,0
0	0,3	0,1
2	0,4	0,1
4	0,3	0,1
24	0,5	0,4
72	0,5	1,7

* b: Werte nach 14 Tagen in 175‰

alle Angaben als O_2 -Umsatz in mg O_2 / g Fg h

Grafik 16: Thallusdehnung nach hypoosmotischem Schock

Salinität in ‰	I n k u b a t i o n s d a u e r in Minuten				
	0	10	30	60	300
0,35	0	5,8 ± 0,2	7,7 ± 0,5	8,4 ± 0,8	9,9 ± 0,6
3,5	0	6,6 ± 0,3	7,4 ± 0,3	8,7 ± 1,6	10,5 ± 0,4
7	0	5,1 ± 0,5	5,4 ± 0,7	5,8 ± 0,4	5,9 ± 0,7
17	0	1,1 ± 0,1	3,4 ± 1,5	3,4 ± 1,6	3,0 ± 0,9
32	0	0,9 ± 1,4	1,0 ± 1,4	1,4 ± 1,6	2,1 ± 1,0

alle Angaben in % (Thalluslänge zu Anfang = 100%)

die SD der 0-Werte (Meßfehler) beträgt ± 0,6%
(n) für alle Proben ≥ 5

Grafik 17: Thalluskontraktion nach hyperosmotischem Schock

Salinität in ‰	I n k u b a t i o n s d a u e r in Minuten				
	0	10	30	60	300
42	0	0,3 ± 0,8	0,5 ± 0,8	0,4 ± 0,4	1,0 ± 0,4
52	0	-2,7 ± 0,5	-2,7 ± 0,7	-2,3 ± 0,9	-1,2 ± 0,7
70	0	-1,7 ± 0,6	-1,9 ± 0,5	-2,9 ± 0,6	-2,0 ± 0,5
105	0	-4,8 ± 1,1	-5,0 ± 1,3	-4,3 ± 1,2	-3,9 ± 1,9
175	0	-11,0 ± 1,1	-11,0 ± 1,2	-10,2 ± 0,9	-10,6 ± 1,1

alle Angaben in % (Thalluslänge zu Anfang = 100%)
positive Werte = Dehnung, negative Werte = Kontraktion

die SD der 0-Werte (Meßfehler) beträgt ± 0,6%
(n) für alle Proben ≥ 5

Grafik 18: Längenänderung toter Thalli

Versuch	Inkubationsdauer in Minuten					*
	0	10	30	60	120	
in 0,35‰						
Glutaraldehyd	0	-2,2	-2,8	-2,6	-3,6	a
Kryo	0	-2,9	-3,7	-3,8	-3,9	a
Triton	0	5,6	5,7	5,8	5,9	b
Ultraschall	0	3,9	4,1	4,0	4,1	b
in 175‰						
Glutaraldehyd	0	-6,0	-5,6	-5,8	-6,4	c
Kryo	0	-4,5	-5,1	-4,2	-4,3	c
Triton	0	-6,2	-6,8	-7,5	-6,1	c
Ultraschall	0	-5,6	-5,4	-6,2	-5,9	c

* die mit gleichem Buchstaben bezeichneten Versuche sind in der Grafik als 1 Mittelwert dargestellt

alle Angaben in % (Thalluslänge zu Anfang = 100%)
positive Werte = Dehnung, negative Werte = Kontraktion

die SD der 0-Werte (Meßfehler) beträgt $\pm 0,6\%$
(n) für alle Proben ≥ 5

Grafik 19 und Grafik 20:

Für diese Grafiken gibt es keine Meßwerte, sie wurden mit dem Computer des CEM 902 hergestellt.

Grafik 21: Wasserverlust bei Austrocknung

Trocknungs- dauer	Restwasser in % Zellwasser		
	bei 50% rel. Feuchte	über Silicagel	in der Feuchtekammer
Stunden			
0	100 ± 0 (21)	100	100
1	66 ± 2 (3)		92
2	49 ± 2 (6)		87
3	45 ± 4 (3)		
4	30 ± 2 (3)	23	86
5	31 ± 1 (6)		86
6	24 ± 2 (3)	14	
10	24 ± 3 (6)	11	97
Tage			
1	14 ± 1 (6)		92
3	14 ± 2 (6)		
7	14 ± 0 (6)	8	
14	14 ± 1 (3)	6	

Grafik 22: Wuchsraten nach Trocknung bei 50% rel. Feuchte

Trocknungs- dauer	Wuchsrate in %	Restwasser in % Zellwasser
Stunden		
0	100 ± 7 (21)	100
1	99 ± 4 (3)	66
2	75 ± 9 (6)	49
3	76 ± 20 (3)	45
4	73 ± 8 (3)	30
5	102 ± 2 (6)	31
6	93 ± 15 (3)	24
8	103 ± 11 (3)	25
9	90 ± 10 (3)	23
10	69 ± 12 (6)	24
Tage		
1	55 ± 11 (6)	14
3	60 ± 19 (6)	14
7	35 ± 13 (6)	14
14	16 ± 13 (3)	14

Grafik 23: Wachsraten nach Trocknung bei untersch. Luftfeuchte

Trocknungs- dauer	S i l i c a g e l		F e u c h t e k a m m e r	
	Wuchsrate in %	Restwasser in % Zellw.	Wuchsrate in %	Restwasser in % Zellw.
Stunden				
0	100 ± 7	100	100 ± 17	100
1				92
2				87
4	76 ± 9	23		86
5			86 ± 16	86
6	71 ± 6	14		
9	26 ± 14	11	89 ± 30	97
Tage				
1			75 ± 9	92
7	0 ± 0	8		
14	0 ± 0	6		

(n) für alle Proben = 3

Grafik 24: Wachsraten in Abhängigkeit vom H₂O-Verlust

H ₂ O-Verlust* in % Zellwasser	Meßwerte 50% rF	Meßwerte Silicagel
49	75	
55	76	
69	102	
70	73	
75	103	
76	93 69	
77	90	76
86	60 55 35 16	71
89		26
92		0
94		0

* umgerechnet aus Grafik 22 + 23

Grafik 25: Photosynthese und Atmung nach Wiederbenetzung

Trocknungs- dauer	Photosynthese bei 300 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$	Atmung bei 0 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$
Stunden		
0	4,20	0,70
1	0,80	0,50
2	0,90	0,55
3	0,20	0,50
4	0,53	0,50
5	0,50	0,45
Tage		
1	0,40	0,40
2	0,20	0,40
3	0,90	0,40
8	0,30	0,55
14	0,10	0,30

alle Angaben als O_2 -Umsatz in $\text{mg O}_2 / \text{g Fg h}$

Im Diskussionsteil

Grafik 26: Phosphatgehalte: HPO_4^{2-} und Polyphosphate

Salinität in ‰	L a d u n g s a u s g l e i c h *			Phosphatgehalte	
	Summe Kationen	Summe Anionen [§]	Ladungen durch HPO_4^{2-}	HPO_4^{2-} $\mu\text{mol}/\text{gFg}$	Poly-P. # $\mu\text{mol}/\text{gFg}$
0,35	133	6	127	63	79
17	166	6	160	80	36
35	171	8	163	81	26
70	439	11	428	214	4
175	237	19	218	109 [§]	0

* diese Werte dienen nur der Berechnung und sind in der Grafik nicht dargestellt. Weitere Erläuterungen im Text.

§ ohne Phosphat

Differenz aus Gesamtphosphat (vgl. Tabelle zu Grafik 5) und den HPO_4^{2-} -Gehalten

§ Meßwert (vgl. Tabelle zu Grafik 5) etwas kleiner, aber noch innerhalb der Standardabweichung

Anhang 4

Angaben zu den Abbildungen

Ergebnisteil 3.1.3.1.

Abb. Nr.	Fixierung*	Einbettung	Nachkontrast
6	Glu	Nanoplast	Uranyl + Blei
7	Glu + Os	Durcupan	--
8	Glu + Os	Durcupan	--
9	Glu + Os	Spurr	Uranyl + Blei
10	Glu + Os	Durcupan	Uranyl + Blei
11	Glu + Os	Durcupan	--
12	Glu + Os	Durcupan	Uranyl + Blei
13	--	Nanoplast	Uranyl + Blei
14	--	Nanoplast	Uranyl + Blei
15	Glu + Os	Spurr	--
16	Glu + Os	Spurr	Uranyl + Blei
17	Gefrierbruch		
18	Gefrierbruch		

Ergebnisteil 3.1.3.2. + 3.1.3.4.

Abb. Nr.	Fixierung*	Einbettung	Nachkontrast
19	--	Nanoplast	Uranyl + Blei
20	Glu + Os	Spurr	Uranyl + Blei
21	Glu	Nanoplast	Uranyl + Blei
22	Glu	Nanoplast	Uranyl + Blei
23	Glu + Os	Spurr	--
24	Glu + Uac	Nanoplast	Uranyl + Blei
25	Glu + Os	Spurr	Uranyl + Blei
26	Glu + Os	Spurr	Uranyl + Blei
27	--	Nanoplast	Uranyl + Blei
28	--	Nanoplast	Uranyl + Blei
29	Glu + Os	Spurr	--
30	Glu + Os	Spurr	--
31	--	Nanoplast	--
32	--	Nanoplast	--

Ergebnisteil 3.2.2.

Abb. Nr.	Fixierung*	Einbettung	Nachkontrast
33	Glu + Os	Spurr	Uranyl + Blei
34	Glu + Os	Spurr	--
35	--	Nanoplast	Uranyl + Blei
36	--	Nanoplast	Uranyl + Blei
37	--	Nanoplast	Uranyl + Blei
38	--	Nanoplast	Uranyl + Blei
39	Glu + Os	Spurr	--
40	--	Nanoplast	Uranyl + Blei

Ergebnisteil 3.3.

Abb. Nr.	Fixierung*	Einbettung	Nachkontrast ¹
41	F/G + Os	Spurr	--
42	F/G + Os	Spurr	Blei
43	F/G + Os	Spurr	--
44	F/G + Os	Spurr	pH 12
45	F/G + Os	Spurr	--
46	F/G + Os	Spurr	EDTA
47	F/G + Os	Spurr	"bleifrei"
48	F/G + Os	Spurr	H ₂ O ₂

* Die Abkürzungen bedeuten:

F/G = Formaldehyd + Glutaraldehyd (1+1)

Glu = Glutaraldehyd

Os = OsO₄

Uac = Uranylacetat (Blockkontrastierung)

¹ Versuche der Testserie zum Kontrastverlust

Abkürzungsverzeichnis

Kennbuchstaben in den Abbildungen

C	Chloroplast
G	Globuli
M	Mitochondrium
N	Nucleus
P	Pyrenoid
pl	Plastoglobuli
S	Stärke
T	Thylakoide
V	Vakuolen
W	Zellwand

Abkürzungen im Text

(alle Abkürzungen sind im Methodenteil erklärt)

AFS	apparent free space (Flüssigkeit in der Zellwand)
ASP ₁₂	künstliches Seewasser-Medium
ECS	extra cellular space (AFS + Haftwasser)
EDXA	Energiedispersive Röntgenmikroanalyse
EELS	Elektronen-Energieverlust-Spektrometrie
ESI	Elektronenspektroskopische Abbildung
Fg	Frischgewicht
MW	Molekulargewicht
org. Tr	organisches Trockengewicht
PES	aufbereitetes Meerwasser
rF	relative Luftfeuchtigkeit
RGR	relative Wachstumsrate
SFg	Schleuder-Frischgewicht
Tg	Trocknungsgewicht
Tr	absolutes Gewebe-Trockengewicht
WR	Wuchsrate
μE	mikro-Einstein (diese Einheit wird hier statt μmol Photonen verwendet, um Verwechslungen mit den Konzentrationsangaben zu vermeiden)

