

**Effekte von UV-Strahlung auf die antarktische  
Rotalge *Palmaria decipiens***

**Effects of UV radiation on the antarctic red alga  
*Palmaria decipiens***

---

**Frank Poppe**

**Ber. Polarforsch. Meeresforsch. 467 (2003)  
ISSN 1618 - 3193**

Frank Poppe  
Stiftung Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung  
Am Handelshafen 12  
27570 Bremerhaven

Die vorliegende Arbeit ist die inhaltlich unveränderte Fassung  
einer Dissertation, die 2002 dem Fachbereich Biologie/Chemie  
der Universität Bremen eingereicht wurde.

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>3</b>
<b>Summary</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1 Ozonabbau und UV-Strahlung	7
1.2 Biologische Effekte der UV-Strahlung	8
1.3 Fragestellung	9
<b>2 Publikationen</b>	<b>11</b>
2.1 Changes in ultrastructure, photosynthetic activity and pigments in the Antarctic Red Alga <i>Palmaria decipiens</i> during acclimation to UV radiation	12
2.2 Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae	22
2.3 The effect of UV radiation on psbA and rbcL gene expression in the Antarctic Red Alga <i>Palmaria decipiens</i>	32
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>49</b>
3.1 Pflanzenmaterial	49
3.2 UV- und PAR-Bestrahlung	49
3.3 Elektronenmikroskopie	50
3.4 Malondialdehyd-Bestimmung	53
3.5 Fettsäurenbestimmung mittels Gaschromatographie	53
3.6 PAM-Fluoreszenztechnik	54
3.7 Pigmentanalysen	54
3.8 77K-Fluoreszenz-Spektroskopie	54
3.9 Northern blotting und Hybridisierung	55
3.10 MAA-Analyse mittels HPLC	56

<b>4</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>57</b>
4.1	UV-induzierte Änderungen der Feinstruktur	57
4.2	UV-induzierte Veränderungen in der Malondialdehyd-Konzentration	58
4.3	UV-induzierte Veränderungen in der Fettsäurenzusammensetzung	58
4.4	UV-induzierte Veränderungen in der Maximalen Quantenausbeute	61
4.5	UV-induzierte Veränderungen der Pigmentkonzentrationen	64
4.6	UV-induzierte Veränderungen im Energiefluss innerhalb des Photosystems	67
4.7	UV-induzierte Veränderungen in der Genexpression	70
4.8	UV-induzierte Veränderungen in den MAA-Konzentrationen	70
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>
5.1	Bestrahlungsbedingungen	74
5.2	Elektronenmikroskopie	74
5.3	Veränderungen der Ultrastruktur, Photosyntheseaktivität und Pigmentkonzentrationen in <i>Palmaria decipiens</i>	76
5.4	Effekte von UV-Strahlung auf die Ultrastruktur von <i>Palmaria decipiens</i> , <i>Palmaria palmata</i> , <i>Phycodrys austrogeorgica</i> und <i>Bangia atropurpurea</i>	78
5.5	Effekte von UV-Strahlung auf die Genexpression von <i>psbA</i> und <i>rbcL</i> in <i>Palmaria decipiens</i>	79
5.6	Schlussbetrachtungen	81
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>82</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>94</b>

## Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Ausdünnung der Ozonschicht über den Polargebieten beobachtet. Die Ursache war vor allem anthropogenen Ursprungs, da FCKWs verantwortungslos in die Atmosphäre freigesetzt wurden. Einhergehend wird ein Anstieg der kurzwelligen UV-B-Strahlung beobachtet, der die Photosynthese von Makroalgen der Küstenzonen, in Abhängigkeit von der morphologischen Struktur und dem jeweiligen Entwicklungsstadium, erheblich beeinträchtigt. Es war aber bisher nicht bekannt, wie UV-Strahlung auf die Ultrastruktur von Algenzellen und ihre Kompartimente wirkt. Daher war das primäre Ziel, den Zusammenhang zwischen verringerter Photosyntheseaktivität und strukturellen Änderungen des Photosyntheseapparats, den Membranen und weiterer zellulärer Kompartimente mit physiologischen und feinstrukturellen Methoden aufzuklären. Mit der vorliegenden Arbeit wurden die strukturellen Ursachen der physiologisch gemessenen Schäden untersucht und mögliche schützende Maßnahmen der Zelle gegen strukturelle Schädigungen durch UV-Strahlung aufgezeigt.

Durch Abbau der Ozonschicht, vor allem über den Polargebieten, erhöht sich die UV-B-Bestrahlungsstärke besonders in der Arktis und Antarktis. Während des Sonnenhöchststandes unter größter Ozonverringerung im November konnten in der Antarktis (King George Island) kurzzeitig bis zu  $1,8 \text{ W m}^2$  UV-B (280 – 320 nm) gemessen werden. Biologisch wirksame Wellenlängen des UV-B-Bereiches können bis in Meerestiefen von 20 m nachgewiesen werden. Da UV-B-Strahlung verschiedene biologische Prozesse schädigen kann, sind Makroalgen daher in den klaren antarktischen Küstengewässern besonders gefährdet.

In dieser Studie wurde zum ersten Mal gezeigt, wie sich natürliche UV-Strahlungsstärken auch auf die Ultrastruktur von Makroalgen auswirken. Chloroplasten und Mitochondrien von zwei unterschiedlichen antarktischen Rotalgenarten zeigen unter UV-Stress strukturelle Veränderungen, wobei z. B. die Schädigungen von *Phycodryas austrogeorgica* aus dem mittleren bis unteren Sublittoral stärkere Ausmaße zeigen als bei *Palmaria decipiens* aus dem oberen Sublittoral. Bei *P. decipiens* wurden vor allem reversible Vesikelbildungen aus den Thylakoiden dokumentiert, wobei die Chloroplasten von *Ph. austrogeorgica* irreversibel zerstört wurden, da die äußere Chloroplastenhülle aufbrach und die Phycobilisomen in das Cytoplasma strömten. Diese Unterschiede spiegeln die Ergebnisse aus Malondialdehyd-Messungen wider, die zeigen, daß die Membransysteme von *Ph. austrogeorgica* einer stärkeren Lipidperoxidation ausgesetzt waren als die von *P. decipiens*. Eine Veränderung der Fettsäurezusammensetzung wurde in *P. decipiens* aber nicht nachgewiesen. Die Membranfluidität ist somit wahrscheinlich durch UV-Stress verändert worden. Neben den Schädigungen von Membranstrukturen zeigte sich in der Ultrastruktur von *Ph. austrogeorgica* eine Zerstörung bzw. ein Abbau von Proteinkristallen. Dies gibt einen Hinweis darauf, daß die UV-geschädigte Pflanze einen erhöhten Stickstoff- bzw. Proteinbedarf für enzymatische Reparaturmechanismen oder geschädigte Enzyme hat.

Die Ultrastrukturergebnisse korrelieren zudem mit dem Absinken der maximalen Quantenausbeute von Photosystem II in beiden Arten. *Ph. austrogeorgica* zeigte eine stärkere Schädigung der Photosynthese, die nach 16 Stunden UV-Bestrahlung nicht mehr repariert wurde. Im Gegensatz konnte bei *P. decipiens* nach dem UV-Stress eine Fähigkeit zur vollständigen Erholung im schwachen Weißlicht nachgewiesen werden. Diese Art konnte sich sogar an eine UV-Expositionsdauer von 15 Tagen anpassen.

Neben aufgetretenen reversiblen Kurzzeiteffekten auf Pigmentkonzentrationen von Chlorophyll *a*, Phycoerythrin und Phycocyanin in beiden Arten, zeigte sich, daß sich die Chlorophyll *a*-Konzentration in *P. decipiens* nach 11 Tagen UV-Exposition nicht veränderte. Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektren deuteten nach 12 Stunden UV-Exposition u.a. auf eine Entkopplung der Energieleitung vom Antennenpigment Phycoerythrin zum Photosystem II hin, die sich jedoch nach einer Weißlicht-Erholungsphase wieder stabilisierte.

Die dargestellten Daten über Veränderungen in der Ultrastruktur, Pigmentkonzentration, Photosynthese-Effizienz und Energieverteilung innerhalb des Photosystems deuten an, daß *P. decipiens* zunächst mit typischen Stressphänomenen auf natürliche UV-Bestrahlungsstärken reagiert. Nach kurzer Zeit akklimatisierte sich die Art aber an die Bedingungen der vorliegenden UV-Bestrahlung, und die vorher beobachteten Stressreaktionen verschwinden wieder. Untersuchungen der Genexpression von Rubisco und des D1-Proteins zeigen, daß das D1-Protein im Reaktionszentrum von Photosystem II unter UV-Stress stärker synthetisiert wird als die Rubisco und somit einer höheren Turnover-Rate unterliegt. Die Ergebnisse deuten eine UV-induzierte transkriptionelle Regulation des photosynthetischen Proteinmetabolismus an.

Die dargestellten Effekte von UV-Strahlung auf *P. decipiens* lassen den Schluss zu, daß diese Art mit wirkungsvollen Akklimatisations- und Schutzmechanismen gegen UV-Stress ausgestattet sein muß. *P. decipiens* besitzt im Gegensatz zu *Ph. austrogeorgica* eine Grundausstattung an UV-absorbierenden mycosporin-ähnlichen Aminosäuren (MAAs). Während *Ph. austrogeorgica* unter UV-Exposition keine MAAs produziert, steigt die MAA-Konzentration in *P. decipiens* schon nach 8 Stunden UV-Bestrahlung an. Nach 11 Tagen stieg die UV-induzierte Produktion von P-334 sogar um den Faktor 14.

*P. decipiens* ist somit sehr gut an den Lebensraum im oberen Sublittoral angepaßt und kann daher relativ schnell auf eine Erhöhung der UV-Bestrahlungsstärken reagieren. *Ph. austrogeorgica* hingegen wäre nach einem weiteren Ozonabbau nicht in der Lage, erhöhte UV-Bestrahlungsstärken zu überleben, da diese Art keine Mechanismen zum Schutz vor schädigender UV-Strahlung besitzt.

## Summary

In the last decades a depletion of the ozone layer over the polar regions was observed. The cause was above all anthropogenic origin, as FCKWs were irresponsibly released in the atmosphere. As a consequence thereof a rise in shortwave UV-B radiation was observed impairing considerably the photosynthesis of macroalgae of coastal zones dependent on the morphological structure and the respective developmental stage. But it has not been known yet how UV radiation affects the ultrastructure of algal cells and their compartments. Therefore the primary object was to clear up the connection between decreased photosynthetic activity and structural changes, the membranes and another cellular compartments with physiological and fine structural methods. With the present work, the structural causes of physiological measured damage was investigated and possible protecting mechanisms of the cell against structural damage by UV radiation were demonstrated.

By degradation of the ozone layer, above all over the polar regions, the UV-B irradiance increased especially in the Arctic and Antarctic. During solar maximum and highest decrease in November in Antarctica (King George Island), up to  $1,8 \text{ W m}^{-2}$  UV-B (280 – 320 nm) could be measured temporarily. In the sea, biological effective wavelengths in the UV range can be detected in depths up to 20 m. As UV-B radiation can affect different biological processes, macroalgae in the clear antarctic shore waters are especially endangered.

In this study, it was shown for the first time how natural UV irradiances impinge on the ultrastructure of macroalgae. Chloroplasts and mitochondria from two different antarctic red algal species show structural changes upon UV stress, whereas the damage of *Phycodryx austrogeorgica* from the middle to lower sublittoral for example shows a higher degree than of *Palmaria decipiens* from the upper sublittoral. In *P. decipiens* reversible forming of vesicles out of the thylakoids were documented, whereas the chloroplasts of *Ph. austrogeorgica* were damaged irreversibly, as the outer chloroplast envelope was damaged and the phycobilisomes flowed into the cytoplasm. These differences reflect the results of the malondialdehyde measurements showing that the membrane systems of *Ph. austrogeorgica* were subjected to a higher lipid peroxidation than of *P. decipiens*. However, a change in fatty acid composition could not be shown in *P. decipiens*. Therefore, the membrane fluidity was likely to be changed by the UV stress. Besides a damage of membrane structures, a destruction or degradation of protein crystals could be shown in the ultrastructure of *Ph. austrogeorgica*. This could be evidence of an increased nitrogen or protein requirement of the UV affected plant for enzymatic repair mechanisms and damaged enzymes, respectively.

Furthermore, the ultrastructural results correlate with the decrease of the maximal quantum yield of photosystem II in both species. *Ph. austrogeorgica* showed a stronger damage of photosynthesis, that could not be repaired after 16 hours of UV radiation. In *P. decipiens* however, a capability of complete recovery in low white light conditions could be detected. This species was even able to adapt to a UV exposition up to 15 days.

Besides the reversible short-time effects on pigment concentrations of chlorophyll *a*, phycoerythrin and phycocyanin in both species, it has been

shown in *P. decipiens* that the chlorophyll *a* concentration did not change after 11 days of UV exposition. Deep temperature fluorescence emission spectra indicate a decoupling of the energy transfer from the accessory antenna pigment phycoerythrin to photosystem II, which stabilized after a white light recovery period, however.

The documented data about changes in the ultrastructure, pigment concentrations, photosynthetic efficiency and energy transfer inside the photosystem indicate that *P. decipiens* firstly reacts with typical stress phenomena on natural UV irradiances. After a short time, this species acclimated to the present UV conditions and the previously observed stress reactions disappeared. Investigations on gene expression of Rubisco and the D1 protein reveal that under UV stress the D1 protein in the reaction centre of photosystem II was stronger synthesized than Rubisco, thus underlying a higher turn-over rate. The results indicate a UV-induced transcriptional regulation of the photosynthetic protein metabolism.

The documented effects of UV radiation on *P. decipiens* lead to the conclusion that this species must be equipped with effective acclimation and protection mechanisms against UV stress. In contrast to *Ph. austrogeorgica*, *P. decipiens* shows a basic equipment of UV absorbing mycosporin-like amino acids (MAAs). Whereas *Ph. austrogeorgica* does not produce any MAAs under UV exposition, *P. decipiens* shows an increase of MAA concentration after 8 hours UV radiation. After 11 days, the production of P-334 increased even 14fold.

Consequently, *P. decipiens* is well adapted on the habitat of the upper sublittoral and is able to react relatively fast on an increase of the UV irradiances. In contrast, after a further ozone loss *Ph. austrogeorgica* would not be able to survive enhanced UV irradiances, as this species does not own mechanisms to protect itself against harmful UV radiation.



## 1 Einleitung

### 1.1 Ozonabbau und UV-Strahlung

Durch anthropogene, aber auch durch biogene Aktivitäten werden chlorierte und bromierte gasförmige Organohalogenverbindungen, wie z.B. Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW) freigesetzt, gelangen in die Atmosphäre und zerstören das stratosphärische Ozon. Seit der Entdeckung des Ozonabbaus über der Antarktis Ende der 70er Jahre (Farman et al., 1985) wurden dort die dramatischsten Ozonverluste von über 50% im Frühjahr (September bis November) beobachtet, so daß zu dieser Jahreszeit von einem „Ozonloch“ gesprochen wird (Frederick und Snell, 1988). Die FCKW werden aufgrund ihrer hohen Halbwertszeit auch in den kommenden 50 Jahren noch in hohen Konzentrationen trotz verstärkter gesetzlicher Reglementierung zur Freisetzung in der Atmosphäre vorliegen. Extrem kalte Temperaturen in der Stratosphäre begünstigen die Bildung von polaren Stratosphärenwolken mit einem verstärkten Ozonabbau um mehr als 50 % im Winter/Frühjahr 1995/1996 über der Arktis (Müller et al., 1997). In den Jahren vor 1978 betrug die durchschnittliche Ozonkonzentration über der Antarktis etwa 300 Dobson Units (DU), während des Ozonlochs 1987 wurden jedoch weniger als 125 DU gemessen. Es muß mit einem stärkerem zeitweiligen Rückgang des Ozongehaltes gerechnet werden, obwohl die Emission dieser problematischen Gase mittlerweile durch internationale Verträge z.T. begrenzt wurde (Farman et al., 1985; Hofmann et al., 1987; Solomon, 1990; Smith et al., 1992).

Der größte Teil der biologisch schädlichen Sonnenstrahlung, d.h. der ultraviolette Strahlungsanteil des UV-C (220-280 nm) und Teile des UV-B (280-320 nm), wird durch die Atmosphäre, insbesondere in der stratosphärischen Ozonschicht, absorbiert (Smith, 1989). Die kürzesten auf die Erdoberfläche auftreffenden Wellenlängen liegen bei ca. 295 nm. Mit abnehmender Ozonkonzentration in der Stratosphäre wird jedoch zunehmend sowohl kürzerwellige Solarstrahlung auftreten, als auch die Bestrahlungsstärke im Wellenlängenbereich unterhalb 300 nm ansteigen. Bedingt durch die biologische Wirkungskurve steigt der gewichtete schädliche UV-Effekt um ein Vielfaches mit kleinerer Wellenlänge an, so daß im kurzwelligen UV-B-Bereich bereits durch minimale Erhöhung der Bestrahlungswerte erhebliche biologische Effekte auftreten werden (Caldwell et al., 1986). In aquatischen polaren Ökosystemen spielt neben der Ozonschicht, Wolken, Schnee- und Eisbedeckung v.a. die Wassersäule eine entscheidende Rolle in der Absorption von UV-Strahlung. Die vertikale Abschwächung wird größtenteils von den hydrographischen Faktoren bestimmt, wie z.B. den spektralen Eigenschaften von gelösten Substanzen, der Konzentration partikulären Materials, aber auch der Dichte und Zusammensetzung des Planktons. In Küstengewässern mit einer starken Trübung und hoher Gelbstoffkonzentration gelangt die UV-Strahlung somit nur einige Dezimeter in die Wassersäule (Smith und Baker, 1979), während im klaren Ozeanwasser UV-B in einer Tiefe von 14 m gemessen werden kann (Baker und Smith, 1982). Im antarktischen Frühsommer, d.h. während der Zeit des Ozonlochs, ist das antarktische Wasser aufgrund von niedrigen Konzentrationen partikulärer und gelöster Substanzen sowie geringen Zelldichten extrem transparent. Dadurch erhöht sich die Eindringtiefe der UV-Strahlung. So wurden zu dieser Zeit biologisch

aktive Wellenlängen des UV-B-Bereiches bis in Tiefen von 20 m nachgewiesen (Karentz und Lutze, 1990). In antarktischen ozeanischen Gewässern wurden 1% der UV-B-Oberflächenstrahlung in Tiefen von 10 – 65 m bestimmt (Gieskes und Kraay, 1990; Vosjan et al., 1996). In antarktischen Küstengewässern hingegen wurden 1%-Tiefen der UV-A-Strahlung von 4 – 24 m gemessen (Hoyer et al., 2001).

## 1.2 Biologische Effekte der UV-Strahlung

Aufgrund ihres hohen Energiegehaltes richtet die UV-Strahlung in lebenden Zellen starke Schäden auf molekularer Ebene an (Karentz et al., 1991). So werden im DNA-Molekül u.a. Thymin-Dimere, Einzelstrangbrüche oder Querverbindungen („crosslinks“) erzeugt, die physiologische Vorgänge beeinträchtigen oder sogar zum Absterben der Organismen führen können (Harm, 1980; Buma et al., 1995). Durch drei verschiedene Reparaturmechanismen, Photoreaktivierung, Exzisionsreparatur und Postreplikationsreparatur, werden geschädigte DNA-Abschnitte repariert (Friedberg, 1985; Hanawalt et al., 1978). Proteine besitzen ein Absorptionsmaximum von 280 nm und werden durch UV-B-Strahlung strukturell geschädigt, so daß es letztlich zum funktionellen Ausfall kommen kann (Vass, 1997). Pflanzliche Proteine, insbesondere diejenigen, die an der Photosynthese beteiligt sind, wie z.B. das Reaktionszentrum-Protein (D<sub>1</sub>) im Photosystem II, werden durch UV-B Strahlung bevorzugt angegriffen (Bornmann und Teramura, 1993). Desweiteren sind Lipide mit isolierten oder konjugierten Doppelbindungen ein potentiell Ziel von UV-Strahlung (Kochevar, 1990). Phospho- und Glycolipide sind Hauptbestandteile von pflanzlichen Zellmembranen und enthalten u.a. ungesättigte Fettsäuren, die in Gegenwart von Sauerstoff durch UV-Strahlung zerstört werden (Lipidperoxidation) (Kramer et al., 1991). UV-Strahlung kann Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), Superoxid-anion-Radikale (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), Hydroxylradikale (OH<sup>\*</sup>) oder Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produzieren, die Membranlipide mit ihren ungesättigten Fettsäuren, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren und Proteine zerstören können (Asada, 1994; Malanga et al., 1997). Enzymatische Schutzsysteme, wie Katalase, Peroxidasen sowie Superoxid-Dismutase (SOD) und Antioxidantien, wie Glutathion (GSH), alpha-Tocopherol (Vitamin E), Flavonoide, beta-Carotin und Ascorbinsäure (Vitamin C) tragen zur Entgiftung von reaktiven Sauerstoffmolekülen bei (Larson, 1988). Die Pflanze kann zudem durch UV-absorbierende Mycosporin-ähnliche Aminosäuren (MAAs) geschützt werden. *P. decipiens* produziert verschiedene MAAs, vor allem P-334, Palythin und Shinorin, und je nach Umweltbedingungen besitzt diese Art immer bestimmte Basiskonzentrationen dieser Schutzpigmente (Karentz et al., 1991; Post und Larkum, 1993; Hoyer et al., 2001). Es ist jedoch nicht bekannt, wie schnell sie als Reaktion auf UV-Bestrahlung von *P. decipiens* produziert werden können. *Ph. austrogeorgica* hingegen besitzt keine MAAs, und es war im Labor auch nicht möglich, die Synthese nachweisbarer Konzentrationen in dieser Art zu induzieren.

Über UV-induzierte Schädigungen der Ultrastruktur pflanzlicher Zellen gibt es in der Literatur nur wenige und hauptsächlich nur auf Einzeller und höhere Pflanzen bezogene Hinweise. So wurden Erweiterungen des Thylakoidinnenraums, Zerstörungen der äußeren Chloroplasten-Doppelmembran sowie aus Thylakoidmembranen gebildete Vesikel beobachtet (Bornmann et al., 1983; Born-

mann et al., 1986; Brandle et al., 1977; Meindl und Lütz, 1996; Lütz et al., 1997). UV-induzierte Veränderungen an Membransystemen wurden von Murphy (1983) zusammengefaßt. Neben den schon erwähnten strukturellen Schädigungen werden funktionelle, d.h. physiologische Effekte diskutiert. So wurden depolarisierte Membranpotentiale mit zunehmendem Austritt von  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Cl^-$ , inhibierte ATPasen sowie peroxidierte Lipide dokumentiert.

Die durch UV-Strahlung hervorgerufenen Effekte führen zu einem Absinken der Photosyntheseaktivität und letztendlich zu einer Verringerung der Biomasseproduktion. Dies hat vermutlich dramatische Konsequenzen für die meisten Ökosysteme, in denen die Primärproduzenten als Grundlage der jeweiligen Nahrungsketten eine verminderte Produktivität aufweisen oder im Extremfall vollständig ausfallen können (Bothwell et al., 1994).

Die Effekte von UV-Strahlung auf Makroalgen sind kaum untersucht, obwohl gerade diese Organismen in den Polargebieten einer erhöhten UV-B Strahlung ausgesetzt werden. In Küstenbereichen sind neben dem Phytoplankton auch Makroalgen und Seegräser für die Primärproduktion verantwortlich. Obwohl ihr Lebensraum nur 0,6 % der Meeresoberfläche ausmacht, tragen sie zu 5 % zur globalen ozeanischen Primärproduktion bei (Smith, 1981). Sie bieten die Nahrungsgrundlage vieler Tierarten, dienen als Kinderstube zahlreicher Fischarten und werden als Puffer gegen große Veränderungen der Nährstoffkonzentrationen in der Wassersäule und als Sedimentstabilisierer angesehen. Eine Erhöhung des UV-B-Anteils in der Sonnenstrahlung könnte zu Veränderungen in der Tiefenzonierung von Makroalgen führen.

Viele der obengenannten UV-B-induzierten Schädigungen höherer Pflanzen treffen auch auf Makroalgen zu, wie z.B. Effekte auf den photosynthetischen Prozess, den Stickstoff-Metabolismus, die DNA-Schädigungen und reduziertes Wachstum (Franklin und Forster, 1997; Bischof et al., 2002). An *Phycodrys austrogeorgica* wurde bisher die Dosisabhängigkeit UV-induzierter Photoinhibition untersucht (Bischof et al., 1998). Post und Larkum dokumentierten die Bildung von UV-absorbierenden Pigmenten und photosynthetische Eigenschaften von *Palmaria decipiens* im antarktischen Jahrgang (Post und Larkum, 1993). Döhler (1998) zeigte an dieser Art Pigmentveränderungen unter UV-Stress und Hanelt et al. (1994) untersuchten an *P. decipiens* die photosynthetische Aktivität, Photoinhibition und Erholung der Photosynthese im Freiland in der Antarktis, allerdings ohne Differenzierung in Wirkungen von PAR und UV-Strahlung.

### 1.3 Fragestellung

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie UV-Strahlung auf die Ultrastruktur von Zellen, ihre Kompartimente, die Genexpression bestimmter photosynthetischer Proteine und damit auf die Physiologie der Algenzelle wirkt. Dazu wurde der Zusammenhang zwischen verringerter Photosyntheseaktivität und den strukturellen Änderungen des Photosyntheseapparats, der Membranen und weiterer zellulärer Kompartimente mit physiologischen, molekularbiologischen und feinstrukturellen Methoden untersucht. Angewendet wurden dabei die Transmissions-Elektronenmikroskopie (chemische sowie Cryofixierung und Gefrierbruch) zur Ultrastrukturaufklärung, *in vivo*-Fluoreszenz-messung mit dem PAM zur Photosynthesemessung, 77K-Fluoreszenz-Emissions-spektroskopie,

photometrische Tests zu MDA- und Pigmentanalysen, Gaschromatographie zur Fettsäurenbestimmung, Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) zur MAA-Analyse und Northern Blotting mit Autoradiographie zur Bestimmung von Transkriptlevels photosynthetischer Proteine. Besonders im Bereich der Ultrastruktur, Fettsäurezusammensetzung und Genexpression liegen keine Literaturdaten von UV-induzierten Effekten bei Makroalgen vor. Die Untersuchungen wurden auf die antarktische Rotalge *Palmaria decipiens* konzentriert, da Rotalgen deutlich stärker auf UV-Stress reagieren als Braun- oder Grünalgen (Bischof et al., 1998; Karsten et al., 2001). Dabei ist *P. decipiens* eine Art, die im oberen Sublittoral wächst und somit der UV-Strahlung stärker ausgesetzt ist als die in einigen Versuchen zu Vergleichszwecken ausgewählte *Phycodrys austrogeorgica*, die im mittleren bis unteren Sublittoral nur mit geringen Bestrahlungsstärken konfrontiert wird (Wiencke und Clayton, 2002).

## 2 Publikationen

### 2.1: Publikation 1

**Poppe, F.**, Hanelt, D., Wiencke, C.: Changes in ultrastructure, photosynthetic activity and pigments in the Antarctic Red Alga *Palmaria decipiens* during acclimation to UV radiation.  
*Botanica Marina* 45 (2002) 253 - 261

### 2.2: Publikation 2

**Poppe, F.**, Schmidt, R.A.M., Hanelt, D., Wiencke, C.: Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae.  
*Phycological Research* 51 (2003) 11 - 19

### 2.3: Publikation 3

**Poppe, F.**, John, U., Hanelt, D., Wiencke, C.: The effect of UV radiation on *psbA* and *rbcL* gene expression in the Antarctic Red Alga *Palmaria decipiens*  
(*Journal of European Phycology*, submitted)

## **Publikation 1**

Poppe, F., Hanelt, D., Wiencke, C.

### **Changes in ultrastructure, photosynthetic Activity and pigments in the Antarctic Red Alga *Palmaria decipiens* during acclimation to UV radiation**

Botanica Marina 45 (2002) 253 - 261

## Changes in Ultrastructure, Photosynthetic Activity and Pigments in the Antarctic Red Alga *Palmaria decipiens* during Acclimation to UV Radiation

F. Poppe<sup>a\*</sup>, D. Hanelt<sup>a,b</sup> and C. Wiencke<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Alfred Wegener Institute, Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven, Germany

<sup>b</sup> Biological Institute Helgoland, Kurpromenade, 27483 Helgoland, Germany

\* Corresponding author: fpoppe@awi-bremerhaven.de

The effect of ultraviolet (UV) radiation on ultrastructure, variable fluorescence of photosystem II and concentrations of photosynthetic pigments in the endemic Antarctic Rhodophyta *Palmaria decipiens* was studied. After 6 and 8 h of artificial UV-exposure a vesiculation of the chloroplast thylakoids and changes in the membrane structure of mitochondria were observed, which disappeared after 12 h of UV treatment. A 60 % reduction of maximum quantum yield of photosynthesis ( $F_v/F_m$ ) was obtained after 4 h of UV-A+B exposure, which recovered up to 80 % after 8 h in darkness and 10 h of white light. Exclusion of UV-B led to a minor reduction of  $F_v/F_m$  to 60 % in the first 4 h of irradiation. The concentration of chlorophyll *a* increased after 4 h of UV exposure, whereas concentrations of phycoerythrin and phycocyanin decreased at the same time. After 12–16 h of UV exposure no significant changes compared to the control were detectable. These findings give an insight into the fine structural and physiological changes during and after UV exposure, and indicate an acclimation of the alga to UV radiation.

### Introduction

Since 1979, a marked depletion of the stratospheric ozone layer over Antarctica has been observed during the early Austral summer in September/October which leads to increased ultraviolet-B (UV-B) radiation at the Earth's surface (Frederick and Snell 1988, Karentz 1994). Ultraviolet radiation has been found to affect marine macroalgae in several ways, including effects on photosynthesis, DNA lesions, nitrogen metabolism and growth, as shown in numerous publications reviewed by Franklin and Forster (1997). Whereas most macroalgal species from the lower sublittoral are not able to acclimate to UV radiation (Karsten *et al.* 2001), a considerable acclimation potential has been shown for a number of brown algae (Bischof *et al.* 1998b, 1999) and green algae (Altamirano *et al.* 2000) from more shallow waters. The acclimation potential of red algae to UV radiation has been studied in *Devaleraea ramentacea* (L.) Guiry (Karsten *et al.* 1999) and in *Palmaria palmata* (L.) O. Kuntze (Hanelt *et al.* 1997, Karsten and Wiencke 1999, Karsten *et al.* 2001). As Hanelt *et al.* (1997) pointed out, *P. palmata* shows a clear response to the different UV ranges, i.e. the UV-B wavelength range is more effective than UV-A in causing photoinhibition. The Antarctic *Palmaria decipiens* (Reinsch) Ricker is known to respond rapidly to changing light conditions. During long term exposure to darkness phycobilins are degraded and photosynthetic rates

are low (Weykam *et al.* 1997, Lüder *et al.* 2001). Immediately after re-exposure to light, however, the alga exhibits a rapid increase in photosynthetic activity and pigment content, and after a few days the photosynthetic apparatus is fully functioning again.

While the effects of UV radiation on the physiology of algae are relatively well documented, only little is known about the influence on the cellular fine structure. Up to now, investigations of UV-induced changes in the ultrastructure of plant cells have focussed on higher plants and microalgae, and so far no data are available for macroalgae.

The objective of the present study was to investigate changes in fine structure during exposure to artificial UV radiation. The results obtained were related to data on photosynthetic performance and the contents of photosynthetic pigments. In this way, new insights will be given into the acclimation to UV radiation by *Palmaria decipiens*.

### Material and Methods

#### Plant material

*Palmaria decipiens* (Reinsch) Ricker was originally isolated on King-George-Island (Antarctica) and kept in stock-cultures in the Alfred Wegener Institute (Bremerhaven, Germany). Male gametophytes raised from stock-cultures were cultivated at 5 °C and 20  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provided by daylight-

fluorescent tubes (Osram L58/W19) under 18 h light:6 h dark cycles. The cultures were aerated in glass vessels filled with filtered sea water (0.2  $\mu\text{m}$  membrane filters, Sartorius Sartobran) which was changed every 10 days. As medium we used Provasoli E.S. (Stein 1973).

### UV irradiation conditions

In the experimental treatment, samples were exposed to artificial UV radiation supplied by UVA-340 fluorescent tubes (Q-Panel, Cleveland, Ohio, USA). Background photosynthetically active radiation (PAR) emitted by additional daylight fluorescent tubes (Osram L58/W19) was adjusted to 16  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Spectral irradiance conditions within the experimental set-up were determined with a Spectro 320 D spectroradiometer (Instrument Systems, Germany) (see Fig. 1). The integrated irradiance of UV-B (280–315 nm) was 0.37  $\text{W m}^{-2}$ , of UV-A (315–400 nm) 6.84  $\text{W m}^{-2}$  and of PAR (400–700 nm) 3.35  $\text{W m}^{-2}$ . Additionally, in experiments with high levels of PAR (500  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), a 50 watt tungsten halogen spotlight (Maxispot-T 50W, Osram, Germany) was used. Cut-off filters (Schott, Germany) were used to exclude UV-B radiation (WG 320) or UV-A+B radiation (GG 400), respectively. Thalli were exposed to white light (control) and to 4, 6, 8, 12 and 16 h of supplementary UV-A+B.

### Electron microscopy

For electron microscopy, samples of irradiated specimens were cryofixed and freeze-substituted. Cryofix-

ation was conducted in a high-pressure freezing machine (HPM 010, Balzers, Liechtenstein) as described by Dahl and Staehelin (1989). Freeze-substitution was performed in an automatic freeze-substitution system (AFS, Reichert, Austria) using the protocol of Steinbrecht and Müller (1987) (fixation 1). Samples were kept in water-free acetone with 0.5 % uranyl acetate at  $-90^\circ\text{C}$  for 50 h, raised from  $-90^\circ\text{C}$  to  $-60^\circ\text{C}$  over 2 h, held at  $-60^\circ\text{C}$  in 2 % osmium tetroxide in dried acetone for 10 h, raised from  $-60^\circ\text{C}$  to  $-30^\circ\text{C}$  in dried acetone for 2 h, held at  $-30^\circ\text{C}$  for 10 h and finally raised to room temperature. A parallel set of samples was freeze-substituted in a medium described by Kaeser (1989) (fixation 2): dimethoxypropan (DMP):water free acetone (1:2 v/v) with 2 % glutaraldehyde, 0.6 % uranyl acetate dissolved in methanol and 1.5 % osmium tetroxide. Samples were kept in the medium at  $-75^\circ\text{C}$  for 72 h, raised from  $-75^\circ\text{C}$  to  $-60^\circ\text{C}$  over 3 h, held at  $-60^\circ\text{C}$  for 72 h, raised from  $-60^\circ\text{C}$  to  $-30^\circ\text{C}$  over 6 h, held at  $-30^\circ\text{C}$  for 24 h. Samples were washed in DMP:acetone (1:2 v/v) for 1 h and in water free acetone for 1 h and finally raised to room temperature. Samples were then infiltrated gradually in Spurr's low-viscosity resin (Spurr 1969) and polymerised 7 days later at  $70^\circ\text{C}$ . Sections were cut on an ultramicrotome (ULTRACUT E, Reichert, Austria) using a diamond knife, collected on formvar-carbon coated copper grids and stained with uranyl acetate and lead citrate after Reynolds (1963). The samples were examined in an electron microscope (EM 902, Zeiss, Germany) at 80 kV.

### Chlorophyll fluorescence measurements

Photosynthetic activity was determined by measuring variable chlorophyll-fluorescence of PS II with a PAM-2000 fluorometer (Walz, Germany). Maximum quantum yield ( $F_v/F_m$ ) was measured as previously described by Hanelt (1998). Specimens ( $n = 4$ ) were mounted at a distance of 3 mm from the end of a fiberoptic probe of the fluorometer and exposed to darkness in a cooled seawater cuvette at  $5^\circ\text{C}$ . After application of a 5 s far-red pulse ( $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at 735 nm) to oxidise the electron transport chain between both photosystems, the samples were kept in darkness for 5 min to exclude energy-dependent fluorescence quenching (qE) and quenching by state transitions (qT). Minimal fluorescence ( $F_0$ ) was subsequently measured with a pulsed red measuring light (approx.  $0.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  at 650 nm). Maximal fluorescence ( $F_m$ ) was determined during a short pulse of saturating white light ( $0.6 \text{ s}$ ,  $\sim 9200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). The ratio of variable to maximal fluorescence ( $F_v/F_m$ , where  $F_v = F_m - F_0$ ) was calculated. Samples were measured before the start of the UV treatment (initial), after 4, 8, 12 and 16 h of UV exposure and after a recovery period (8 h of subsequent darkness followed by 10 h of white light treatment at  $25 \mu\text{mol}$

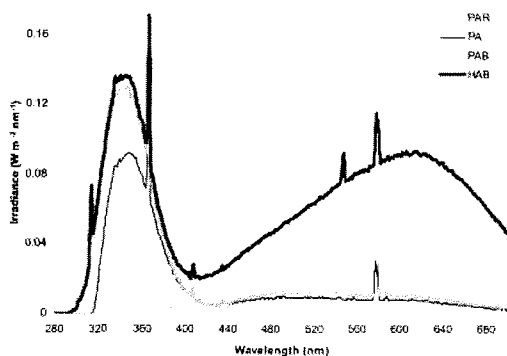


Fig. 1. Spectral irradiance of the UV-range (280–400 nm) and PAR (400–700 nm) emitted by the lamps and the effect of the cut-off filters used in the experiments. PAR: GG 400, PA (PAR + UV-A): WG 320, PAB (PAR + UV-A + UV-B): WG 280, HAB (high PAR + UV-A + UV-B): WG 320 + halogen spotlights.



photons  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). The means of the measured values of unstressed controls under UV-exclusion were normalised to 100 %.

### Pigment analysis

Chlorophyll *a* (chl *a*) was extracted for 5 days in *N,N*-dimethylformamide (DMF) in darkness at 4 °C ( $n = 5$ ). The extinction of the DMF solution was measured at 664.5 nm in a UVPC 2040 spectrophotometer (Shimadzu, Japan). The chl *a* content was calculated using the formula:  $\text{Chl } a \text{ (mg/g FW)} = 12.7 E_{664.5}$  after Inskeep and Bloom (1985). Biliproteins were extracted in 0.1 M phosphate buffer (pH = 6.8) after grinding the frozen algal material in liquid nitrogen and quartz sand. The extracts were centrifuged at 15000 g for 20 min, and the supernatant was used for phycoerythrin (PE) and phycocyanin (PC) determination. The concentrations were measured spectrophotometrically according to Beer and Eshel (1985) by using the following formulae:

$$\text{PE} = ((A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) 0.20) 0.12$$

$$\text{PC} = ((A_{618} - A_{645}) - (A_{592} - A_{645}) 0.51) 0.15$$

The means of the measured values of unstressed controls under UV-exclusion were normalised to 100 %.

### Data treatment

Mean values and their standard deviations were calculated from the different replicates per treatment. Statistical significances of data with homogeneous variances were tested with a one-way model I analysis of variance (ANOVA). All standardised data were arcsine transformed before and groups were compared using the Student-Newman-Keuls test (Sokal and Rohlf 1995). Differences were considered to be statistically significant if the *p*-value was  $\leq 0.05$  (significance level of 5 %).

## Results

### Ultrastructure

The fine structure of cells from control algae (Figs 2 and 3) and from algae irradiated with UV-A+B radiation for 4 h (Fig. 4) did not show any differences. Chloroplasts showed the normal pattern of parallel arranged thylakoids, with phycobilisomes attached to the outside of the thylakoid membranes, as is characteristic of red algal species. The mitochondria were normally rod shaped with tubular cristae (Figs 2 and 4).

After 6 and 8 h of UV radiation, pronounced changes in the ultrastructure of chloroplasts (Figs 5–7) and mitochondria (Fig. 8) were observed. The thylakoids were disrupted, and appeared to be connected with translucent vesicles of about 0.5  $\mu\text{m}$

in diameter. Stroma and phycobilisomes can still clearly be recognised inside the vesicles. These structural changes were predominantly present on the side of the thallus exposed to the UV source, whereas the shaded side was less affected. The cristae in the mitochondria were swollen and appeared mostly as sacculi (Fig. 8). After 12 h of UV treatment, these changes disappeared and the fine structure of the cells was similar to the control. Nuclei, Golgi bodies and endoplasmic reticulum (ER) did not show any conspicuous structural change after UV radiation treatment.

### Chlorophyll fluorescence measurements

After 4 h of exposure to UV-A, photosynthetic efficiency decreased significantly by 39 % ( $p < 0.001$ ), while samples exposed to UV-A+B exhibited a significant decrease of about 60 % ( $p < 0.001$ ) (Fig. 9). Under high PAR plus UV-A+B,  $F_v/F_m$  decreased significantly to about 59 % compared to the control ( $p < 0.001$ ), i. e. no further decrease was induced as a result of high PAR irradiation. Similar results were obtained after 8 and 12 h of exposure to the respective treatments. After 16 h, however, there was no difference in the reaction between exposure to PAR plus UV-A and PAR plus UV-A + UV-B, while supplemental high light reduced  $F_v/F_m$  to a much larger degree ( $p < 0.001$ ).

Within 18 h of darkness and white light, *Palmaria decipiens* recovered from all UV treatments in a similar way and reached 80 % of the untreated control.

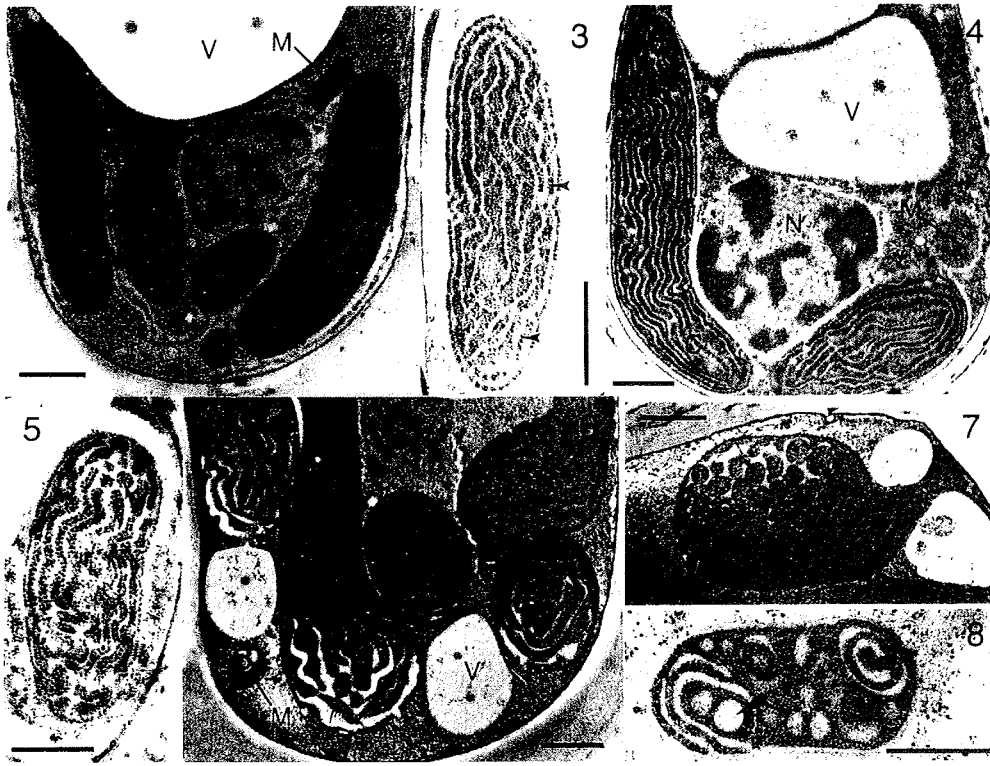
### Photosynthetic pigment contents

Throughout the experiment, no significant changes in chl *a* concentrations were detected (Fig. 10). After 4 h of UV-A and high PAR plus UV-A+B radiation, chl *a* concentrations showed a tendency to increase. After 8 h of different UV treatments, however, the chl *a* contents were similar in all samples.

Additional UV-B exposure causes primarily a decrease of the concentrations of both phycobilins compared to the control and the exposure to UV-A (Figs 11 and 12). Then, the pigment concentrations increased after 8 h of irradiation and was statistically similar to the control in the 12 and 16 h exposure.

### Discussion

This is the first study showing UV effects on the ultrastructure in macroalgae. The high pressure freezing method for fixation with subsequent freeze-substitution allows the preservation of intact phycobilisomes, a major advantage compared to conventional chemical fixation. Up till now, intact phycobilisomes attached to the thylakoid membrane have been mainly shown in cyanobacteria and unicellular red algae



Figs 2–8. Effect of UV radiation on the fine structure of *Palmaria decipiens*. Fig. 2. Fine structure from an UV-untreated specimen with typical chloroplasts and mitochondria (fixation 1). Fig. 3. Typical chloroplast fine structure in an UV-untreated individual (fixation 1). Arrowheads point to phycobilisomes. Fig. 4. Cell fine structure in a specimen, irradiated for 4 h with UV-A+B showing the unchanged structure of chloroplasts and mitochondria (fixation 1). Fig. 5. Chloroplast of a specimen irradiated for 6 h with UV-A+B showing formation of 'inside-out' vesicles (arrow). Arrowhead points to a phycobilisome (fixation 2). Fig. 6. Cell of specimen irradiated for 8 h with UV-A+B showing vesiculation of thylakoids (arrow; fixation 1). Fig. 7. Chloroplast of a specimen irradiated for 8 h with UV-A+B showing strong vesicle formation (arrow) in the chloroplast (fixation 1). Fig. 8. Mitochondrion of a specimen irradiated for 8 h with UV-A+B with cristae enlarged to sacculi (arrowhead) (fixation 1). C = chloroplast, M = mitochondrion, N = nucleus, V = vacuole. Scale bars = 1 µm (Figs 2–7) or 0.5 µm (Fig. 8).

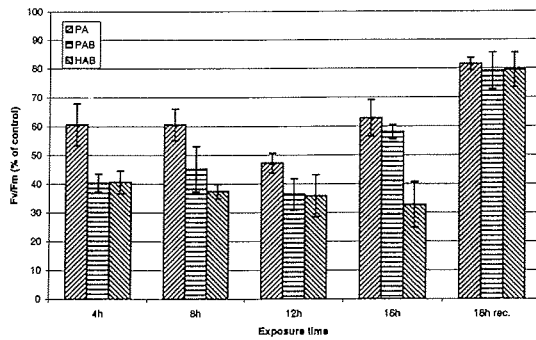


Fig. 9. Influence of different radiation conditions on maximal quantum yield ( $F_v/F_m$ ) of *P. decipiens*. Values are expressed as percentage of the control. For abbreviations see Fig. 1.

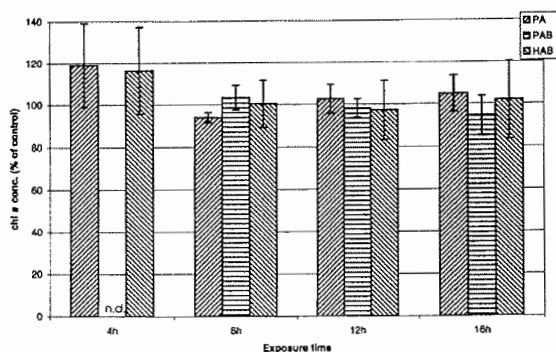


Fig. 10. Changes of chlorophyll *a* concentration under different radiation conditions. n.d. = not determined. For abbreviations see Fig. 1.

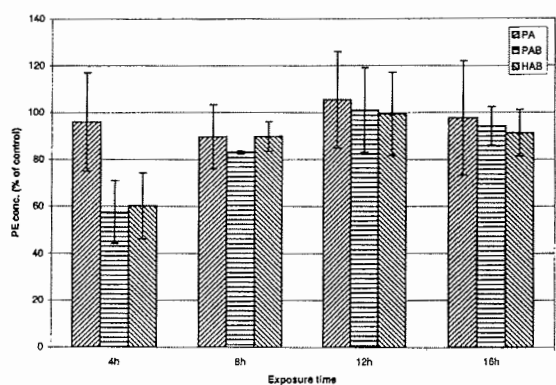


Fig. 11. Changes of phycoerythrin (PE) concentration under different radiation conditions. For abbreviations see Fig. 1.

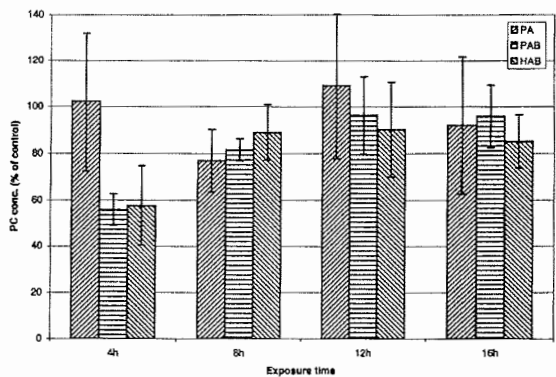


Fig. 12. Changes of phycocyanin (PC) concentration under different radiation conditions. For abbreviations see Fig. 1.

(Gantt and Conti 1967, Van Eykelburg 1979, Mörschel and Rhiel 1987, Lange *et al.* 1990) but not so well in macroalgae (Waaland *et al.* 1974, Poeschel and van der Meer 1984, Rascio *et al.* 1991, Tsekos *et al.* 1996, Talarico 1996, Foltran *et al.* 1996). Chemical fix-

ation depends on the penetration time of the fixative, therefore cryofixed biological samples show the native state rather than a chemically fixed one. In many cells, the best preparation for the preservation of cellular ultrastructure is high pressure freezing (Gilkey

and Staehelin 1986, Kiss and Staehelin 1995). However, cryofixation followed by freeze-substitution also has its limitations, for example a reduced infiltration of resin and poor membrane contrast (Babuka and Poeschel 1998, Bourett *et al.* 1999, Dubochet and Sartori Blanc 2001).

For all parameters studied, *Palmaria decipiens* exhibited an initial response after the UV treatment which was reversible under prolonged exposure. This might indicate the capability of the organism to acclimate to moderate fluences of UV radiation. Initially, UV appears to induce changes in the ultrastructure of chloroplasts and mitochondria, of chl *a*, phycobilin concentrations and of photosynthetic efficiency. However, these effects on ultrastructure, chl *a* and phycobilin concentrations were reversible after prolonged UV irradiation. These findings suggest the activation of a protective mechanism in response to UV-induced damage of membrane structures and function especially of the photosynthetic apparatus.

Various effects of UV radiation on the fine structure of chloroplasts of higher plants and microalgae have been previously documented. In this study, the most striking effect is the disruption of the thylakoids and the formation of translucent 'inside-out' vesicles which are comparable with effects during senescence of chloroplasts (Hurkman 1979, Hudák 1981, Biswal and Biswal 1988). Similarly, Brandle *et al.* (1977) found vesicles being formed from the thylakoids in the stroma, together with completely disrupted outer double membranes of the chloroplasts in *Pisum sativum* L. seedlings exposed to UV-B-radiation. Bornmann *et al.* (1983) and He *et al.* (1994) also reported dilation of thylakoids and membrane degradation after irradiation of *Beta vulgaris* L. and *Pisum sativum* L. leaves with supplementary UV-B radiation. A disintegration of the grana and a loss of the net-like arrangement was observed in UV-irradiated cells of the unicellular green alga *Micrasterias denticulata* Breb. under abnormally high UV-B irradiances (280–320 nm 9 W m<sup>-2</sup>, 320–400 nm 26.8 W m<sup>-2</sup>) (Meindl and Lütz 1996, Lütz *et al.* 1997). Furthermore, in these studies an abnormal UV-A:UV-B ratio of 3:1 was applied, not equating to the natural ratios observed in the field of about 20:1. The UV-B irradiance applied in our study (0.37 W m<sup>-2</sup>) corresponds more closely to the field condition observed in Antarctica during summer (Hoyer *et al.* 2001).

In all these studies of UV-effects on ultrastructure, it has not been demonstrated that the inner surface of the thylakoids becomes exposed to the stroma. In untreated cells, the chloroplast intra-thylakoidal space (lumen) is relatively small in relation to the stroma while in the case of 'inside-out' vesicles, the lumen seems to be strongly dilated. Furthermore, it should be pointed out that the molecular structure of the thylakoid membranes might not be changed. This means, no proton gradient can be established and consequently the light reactions may be impaired in

this part of the chloroplast. Depolarisation of the membrane potential induced by UV, net leakage of Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> and differences in ATPase activity, have previously been documented in cell (Doughty and Hope 1973, Murphy 1983, Gallo *et al.* 1989) and thylakoid membranes (Iwanzik *et al.* 1983, Chow *et al.* 1992, Hideg and Vass 1996). As these changes in ion-permeability of the thylakoid membranes take place within a few hours of UV-B exposure, these results may be related to our findings of vesiculated thylakoid membranes. Furthermore, it has been found that UV radiation leads to a depletion of unsaturated fatty acids in membranes by lipid peroxidation and therefore decreases the unsaturated/saturated fatty acid ratio impairing membrane stability (Kramer *et al.* 1991).

In higher plants, Lichtscheidl-Schultz (1985) and Santos *et al.* (1993) have documented UV-induced changes in the structure of mitochondria similar to those observed in this study. These ultrastructural changes may result in a disturbance of the ATP metabolism (Vosjan *et al.* 1990).

It is well documented that photosystem II is an important target of UV-B in higher plants and macroalgae (Post *et al.* 1992, Neale *et al.* 1993, Vass 1997). In this experiment, photosynthetic efficiency of *Palmaria decipiens* is inhibited by the UV-A and UV-B radiation conditions applied here, but the photosynthetic apparatus might not be damaged, as the algae can largely recover from UV stress. Moreover, UV-A alone causes a less pronounced photoinhibition than UV-A + UV-B, and additional high light treatment plus UV-A + UV-B did not cause a stronger photoinhibition than under the respective low light condition. This indicates that *Palmaria decipiens* is well adapted to high levels of PAR. Similar findings in *Palmaria palmata* show that particularly UV-B was effective in causing inhibition of photosynthesis and that both shallow-water species are able to recover from photoinhibition induced by moderate UV stress (Hanelt *et al.* 1997, Karsten *et al.* 2001). It has already been demonstrated that the degree of UV/light-induced inhibition and recovery of photosynthesis correlates with the depth distribution of different macroalgal species (Larkum and Wood 1993, Maegawa *et al.* 1993, Dring *et al.* 1996, Hanelt 1998, Bischof *et al.* 1998a).

The effects of UV radiation on the photosynthetic pigments of *Palmaria decipiens* presented in this study are similar to previous results from different micro- (Buma *et al.* 1996, Döhler 1996) and macroalgae (Algarra and Niell 1990, Döhler *et al.* 1995, Döhler 1998, Grobe and Murphy 1998, Bischof *et al.* 2000). All of these results indicate an initial short-term synthesis of chl *a* as a response to UV radiation and a further acclimation to changing irradiation conditions.

The phycobilins react differently compared to chl *a*, as they show initial decreases under all UV radia-

tion treatments. This indicates a short-term damaging effect to the phycobilin pigments, before a *de novo* synthesis starts. Furthermore, there was no disaggregation of phycoerythrin monomers from phycobilisomes until 16 h of UV treatment, as the effect of UV radiation on phycocyanin is comparable to the effect on phycoerythrin, because fluorescence emission spectra at 77 K did not show any changes and the PE:PC ratios were stable around 25:1 throughout the experiment (data not shown). High light plus UV-A+B has the same effect on the phycobilin concentrations as UV-A+B under low light conditions, indicating that supplementary high light of 500  $\mu\text{mol}$  does not lead to a further degradation of phycoerythrin. Our results are in line with other studies on UV-induced effects on phycobilins showing that these pigments are damaged earlier than chl *a* (Häder and Häder 1989, Cordi *et al.* 1997).

For marine macroalgae, two major strategies have been described in response to UV exposure. One is based on the activity of antioxidant enzymes. In *Palmaria decipiens* the activities of glutathione reductase and superoxide dismutase are increased by UV radiation (Aguilera, personal communication). Photosynthesis may also be protected by UV sunscreen pigments, such as mycosporine-like amino acids (MAAs). This has been shown in *Devaleraea ramentacea* (L.) Guiry, also a member of the Palmariales

(Karsten *et al.* 1999). *Palmaria decipiens* contains several MAAs (Karentz *et al.* 1991, Post and Larkum 1993) depending on the radiation conditions (Hoyer *et al.* 2001). Furthermore, this species always contains MAAs in variable concentrations, depending on environmental conditions. The rapid changes in the ultrastructure and pigment concentrations suggest that these protective mechanisms may be activated within a few hours. Rapid changes in MAA content (Gómez *et al.* 1998) and also in antioxidant synthesis or activity (Wildi and Lütz 1996, Hazzard *et al.* 1997, Butow *et al.* 1997) have been documented previously.

The results of this study show that the species studied, which grows in the intertidal and upper sublittoral (Hoyer *et al.* 2001, Wiencke and Clayton 2002), is well adapted to this zone. In particular, this species appears to have the ability to rapidly acclimate the photosynthetic apparatus to changes in the UV radiation regime.

#### Acknowledgements

We are indebted to the Deutsche Forschungsgemeinschaft for financial support, and to Kai Bischof as well as Monica Schoenwaelder for critically reading the manuscript.

Accepted 29 January 2002.

#### References

- Algarra, P. and F. X. Niell. 1990. Short-term pigment response of *Corallina elongata* Ellis et Solander to light intensity. *Aquat. Bot.* 36: 127–138.
- Altamirano, M., A. Flores-Moya and F. L. Figueroa. 2000. Long-term effects of natural sunlight under various ultraviolet radiation conditions on growth and photosynthesis of intertidal *Ulva rigida* (Chlorophyceae) cultivated *in situ*. *Bot. Mar.* 43: 119–126.
- Babuka, S. J. and C. M. Pueschel. 1998. A freeze-substitution ultrastructural study of the cytoskeleton of the red alga *Antithamnion kyllinii* (Ceramiales). *Phycologia* 37: 251–258.
- Beer, S. and A. Eshel. 1985. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 36: 785–792.
- Bischof, K., D. Hanelt and C. Wiencke. 1998a. UV-radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. *Mar. Biol.* 131: 597–605.
- Bischof, K., D. Hanelt, H. Tüg, U. Karsten, P. E. M. Brouwer and C. Wiencke. 1998b. Acclimation of brown algal photosynthesis to ultraviolet radiation in Arctic coastal waters (Spitsbergen, Norway). *Polar Biol.* 20: 388–395.
- Bischof, K., D. Hanelt and C. Wiencke. 1999. Acclimation of maximal quantum yield of photosynthesis in the brown alga *Alaria esculenta* under high light and UV radiation. *Plant Biol.* 1: 435–444.
- Bischof, K., D. Hanelt and C. Wiencke. 2000. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. *Planta* 211: 555–562.
- Biswal, U. C. and B. Biswal. 1988. Ultrastructural modifications and biochemical changes during senescence of chloroplasts. *Inter. Rev. Cytol.* 113: 271–321.
- Bornmann, J. F., R. F. Evert and R. J. Mierzwa. 1983. The effect of UV-B and UV-C radiation on sugar beet leaves. *Protoplasma* 117: 7–16.
- Bourett, T. M., K. J. Czymmek and R. J. Howard. 1999. Ultrastructure of chloroplast protuberances in rice leaves preserved by high-pressure freezing. *Planta* 208: 472–479.
- Brandle, J. R., W. F. Campbell, W. B. Sisson and M. M. Caldwell. 1977. Net photosynthesis, electron transport capacity, and ultrastructure of *Pisum sativum* L. exposed to ultraviolet-B radiation. *Plant Physiol.* 60: 165–169.
- Buma, A. G. J., H. J. Zemmeling, K. Sjollem and W. W. C. Gieskes. 1996. UVB radiation modifies protein and photosynthetic pigment content, volume and ultrastructure of marine diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142: 47–54.
- Butow, B. J., D. Wynne and E. Tel-Or. 1997. Antioxidative protection of *Peridinium gatunense* in Lake Kinneret: Seasonal and daily variation. *J. Phycol.* 33: 780–786.
- Chow, W. S., A. Strid and J. M. Anderson. 1992. Short-term treatment of pea plants with supplementary ultraviolet-B radiation: Recovery time-courses of some photosynthetic functions and components. In: (N. Murata, ed.) *Research in Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 361–364.

- Cordi, B., M. H. Depledge, D. N. Price, L. F. Salter and M. E. Donkin. 1997. Evaluation of chlorophyll fluorescence, in vivo spectrophotometric pigment absorption and ion leakage as biomarkers of UV-B exposure in marine macroalgae. *Mar. Biol.* 130: 41–49.
- Dahl, R. and L. A. Staehelin. 1989. High-pressure freezing for the preservation of biological structure: Theory and practice. *J. Electron Microsc. Tech.* 13: 165–174.
- Döhler, G. 1996. Effect of UV irradiance on utilization of inorganic nitrogen by the Antarctic diatom *Odontella weissflogii* (Janisch) Grunow. *Bot. Acta* 109: 35–42.
- Döhler, G. 1998. Effect of UV radiation on pigments of the Antarctic macroalga *Leptosomia simplex* L. *Photosynthetica* 35: 473–476.
- Döhler, G., E. Hagmeier and C. David. 1995. Effects of solar and artificial UV irradiation on pigments and assimilation of  $^{15}\text{N}$  ammonium and  $^{15}\text{N}$  nitrate by macroalgae. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 30: 179–187.
- Doughty, C. J. and A. B. Hope. 1973. Effects of ultraviolet radiation on the membranes of *Chara corallina*. *J. Membr. Biol.* 13: 185–198.
- Dring, M. J., A. Wagner, J. Boeskov and K. Lüning. 1996. Sensitivity of intertidal and subtidal red algae to UVA and UVB radiation, as monitored by chlorophyll fluorescence measurements: influence of collection depth and season, and length of irradiation. *Eur. J. Phycol.* 31: 293–302.
- Dubochet, J. and N. Sartori Blanc. 2001. The cell in absence of aggregation artifacts. *Micron* 32: 91–99.
- Foltran, A., G. Maranzana, N. Rascio, L. Scarabel, L. Talarico and C. Andreoli. 1996. *Iridea cordata* from Antarctica: An ultrastructural, cytochemical and pigment study. *Bot. Mar.* 39: 533–541.
- Franklin, L. A. and R. M. Forster. 1997. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *Eur. J. Phycol.* 32: 207–232.
- Frederick, J. E. and H. E. Snell. 1988. Ultraviolet radiation levels during the Antarctic spring. *Science* 241: 438–440.
- Gallo, R. L., I. E. Kochevar and R. D. Granstein. 1989. Ultraviolet radiation induces a change in cell membrane potential *in vitro*: A possible signal for ultraviolet radiation induced alteration in cell activity. *Photochem. Photobiol.* 49: 655–662.
- Gantt, E. and S. F. Conti. 1967. Phycobiliprotein localization in algae. In: *Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus: Report of Symposium*. Biology Dept., Brookhaven National Laboratory, Upton, N.Y. pp. 393–405.
- Gilkey, J. C. and L. A. Staehelin. 1986. Advances in ultrarapid freezing for the preservation of cellular ultrastructure. *J. Electron Microsc. Tech.* 3: 177–210.
- Gómez, I., E. Pérez-Rodríguez, B. Vinegla, F. L. Figueroa and U. Karsten. 1998. Effects of solar radiation on photosynthesis, UV-absorbing compounds and enzyme activities of the green alga *Dasycladus vermicularis* from Southern Spain. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 47: 46–57.
- Grobe, C. W. and T. M. Murphy. 1998. Solar ultraviolet-B radiation effects on growth and pigment composition of the intertidal alga *Ulva expansa* (Setch.) S. & G. (Chlorophyta). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 225: 39–51.
- Häder, D.-P. and M. A. Häder. 1989. Effects of solar and artificial radiation on motility and pigmentation in *Cyanophora paradoxa*. *Arch. Microbiol.* 152: 453–457.
- Hanelt, D. 1998. Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. *Mar. Biol.* 131: 361–369.
- Hanelt, D., C. Wiencke and W. Nultsch. 1997. Influence of UV radiation on the photosynthesis of Arctic macroalgae in the field. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 38: 40–47.
- Hazzard, C., M. P. Lesser and R. A. Kinzie III. 1997. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis in the subtropical marine diatom, *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 33: 960–968.
- He, J., L.-K. Huang and M. I. Whitecross. 1994. Chloroplast ultrastructure changes in *Pisum sativum* associated with supplementary ultraviolet (UV-B) radiation. *Plant, Cell Environment* 17: 771–775.
- Hideg, E. and I. Vass. 1996. UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. *Plant Science* 115: 251–260.
- Hoyer, K., U. Karsten, T. Sawall and C. Wiencke. 2001. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211: 117–129.
- Hudák, J. 1981. Plastid senescence I. Changes of chloroplast structure during natural senescence in cotyledons of *Sinapis alba* L. *Photosynthetica* 15: 174–178.
- Hurkman, W. J. 1979. Ultrastructural changes of chloroplasts in attached and detached, aging primary wheat leaves. *Amer. J. Bot.* 66: 64–70.
- Inskip, W. P. and P. R. Bloom. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in *N,N*-Dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.* 77: 483–485.
- Iwanzik, W., M. Tevini, G. Dohnt, M. Voss, W. Weiss, P. Gräber and G. Renger. 1983. Action of UV-B radiation on photosynthetic primary reactions in spinach chloroplasts. *Physiol. Plant.* 58: 401–407.
- Kaesler, W. 1989. Freeze-substitution of plant tissues with a new medium containing dimethoxypropane. *J. Microsc.* 154: 273–278.
- Karentz, D. 1994. Ultraviolet tolerance mechanisms in antarctic marine organisms. In: (C. S. Weiler and P. A. Penhale, eds) *Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects*. American Geophysical Union, Washington, D. C. pp. 93–110.
- Karentz, D., F. S. Mc Euen, M. C. Land and W. C. Dunlap. 1991. Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Mar. Biol.* 108: 157–166.
- Karsten, U. and C. Wiencke. 1999. Factors controlling the formation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Palmaria palmata* from Spitsbergen (Norway). *J. Plant Physiol.* 155: 407–415.
- Karsten, U., K. Bischof, D. Hanelt, H. Tüg and C. Wiencke. 1999. The effect of ultraviolet radiation on photosynthesis and ultraviolet-absorbing substances in the endemic Arctic macroalga *Devaleraea ramentacea* (Rhodophyta). *Physiol. Plant.* 105: 58–66.
- Karsten, U., K. Bischof and C. Wiencke. 2001. Photosynthet-

- ic performance of Arctic macroalgae after transplantation from deep to shallow waters. *Oecologia* 127: 11–20.
- Kiss, J. Z. and L. A. Staehelin. 1995. High pressure freezing. In: (N. J. Severs and D. M. Shotton, eds) *Rapid Freezing, Freeze Fracture and Deep Etching*. Wiley-Liss, Somerset, N. J. pp. 89–104.
- Kramer, G. F., H. A. Norman, D. T. Krizek and R. M. Mirecki. 1991. Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry* 30: 2101–2108.
- Lange, W., C. Wilhelm, W. Wehrmeyer and E. Mörschel. 1990. The supramolecular structure of photosystem II-phycobilisome-complexes of *Porphyridium cruentum*. *Bot. Acta* 103: 250–257.
- Larkum, A. W. D. and W. F. Wood. 1993. The effect of UV-B radiation on photosynthesis and respiration of phytoplankton, benthic macroalgae and seagrasses. *Photosynthesis Res.* 36: 17–23.
- Lichtscheidl-Schultz, I. 1985. Effects of UV-C and UV-B on cytomorphology and water permeability of inner epidermal cells of *Allium cepa*. *Physiol. Plant.* 63: 269–276.
- Lüder, U. H., J. Knötzel and C. Wiencke. 2001. Acclimation of photosynthesis and pigments to seasonally changing light conditions in the endemic Antarctic red macroalga *Palmaria decipiens*. *Polar Biol.* 24: 598–603.
- Lütz, C., H. K. Seidlitz and U. Meindl. 1997. Physiological and structural changes in the chloroplast of the green alga *Micrasterias denticulata* induced by UV-B simulation. *Plant Ecology* 128: 54–64.
- Maegawa, M., M. Kunieda and W. Kida. 1993. The influence of ultraviolet radiation on the photosynthetic activity of several red algae from different depths. *Jpn. J. Phycol. (Sorui)* 41: 207–214.
- Meindl, U. and C. Lütz. 1996. Effects of UV irradiation on cell development and ultrastructure of the green alga *Micrasterias*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 36: 285–292.
- Mörschel, E. and E. Rhiel. 1987. Phycobilisomes and thylakoids: The light-harvesting system of cyanobacteria and red algae. In: (J. R. Harris and R. W. Horne, eds) *Membranous Structures*. Academic Press, London. pp. 210–254.
- Murphy, T. M. 1983. Membranes as targets of ultraviolet radiation. *Physiol. Plant.* 58: 381–388.
- Neale, P. J., J. C. Cullen, M. P. Lesser and A. Melis. 1993. Physiological bases for detecting and predicting photoinhibition of aquatic photosynthesis by PAR and UV radiation. In: (H. Y. Yamamoto and C. M. Smith, eds) *Photosynthetic Responses to the Environment*. American Society of Plant Physiologists, Rockville. pp. 61–77.
- Post, A. and A. W. D. Larkum. 1993. UV-absorbing pigments, photosynthesis and UV exposure in Antarctica: comparison of terrestrial and marine algae. *Aquat. Bot.* 45: 231–243.
- Post, A., S. Gentle and A. W. D. Larkum. 1992. Algal photosynthesis: inhibition by UV-B radiation, recovery and UV-absorbing pigments. In: (N. Murata, ed.) *Research in Photosynthesis, Vol. IV*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 847–850.
- Pueschel, C. M. and J. P. van der Meer. 1984. Ultrastructural characterization of a pigment mutant of the red alga *Palmaria palmata*. *Can. J. Bot.* 62: 1101–1107.
- Rascio, N., P. Mariani, F. Dalla Vecchia and R. Trevisan. 1991. The vegetative thallus of *Pterocladia capillacea* (Gelidiales, Rhodophyta) I. An ultrastructural and cytochemical study. *Bot. Mar.* 34: 177–185.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208–212.
- Santos, I., J. M. Almeida and R. Salema. 1993. Plants of *Zea mays* L. developed under enhanced UV-B radiation. I. Some ultrastructural and biochemical aspects. *J. Plant Physiol.* 141: 450–456.
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf. 1995. *Biometry* (3rd ed.). W. H. Freeman & Company, New York. pp. 887.
- Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastructure Research* 26: 31–43.
- Stein, J. R. 1973. *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 448.
- Steinbrecht, R. A. and M. Müller. 1987. Freeze-substitution and freeze-drying. In: (R. A. Steinbrecht and K. Zierold, eds) *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 149–172.
- Talarico, L. 1996. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. *Sci. Mar.* 60: 205–222.
- Tsekos, I., H.-D. Reiss, S. Orfanidis and N. Orologas. 1996. Ultrastructure and supramolecular organization of photosynthetic membranes of some marine red algae. *New Phytol.* 133: 543–551.
- Van Eykelenburg, C. 1979. The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity. *Antonie van Leeuwenhoek-J. Microbiol. Serol.* 45: 369–390.
- Vass, I. 1997. Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. In: (M. Pessaraki, ed) *Handbook of Photosynthesis*. Marcel Dekker, New York. pp. 931–949.
- Vosjan, J. H., G. Döhler and G. Nieuwland. 1990. Effect of UV-B irradiance on the ATP content of microorganisms of the Weddell Sea (Antarctica). *Neth. J. Sea Res.* 25: 391–394.
- Waaland, J. R., S. D. Waaland and G. Bates. 1974. Chloroplast structure and pigment composition in the red alga *Griffithsia pacifica*: regulation by light intensity. *J. Phycol.* 10: 193–199.
- Weykam, G., D. N. Thomas and C. Wiencke. 1997. Growth and photosynthesis of the Antarctic red algae *Palmaria decipiens* (Palmariales) and *Iridaea cordata* (Gigartinales) during and following extended periods of darkness. *Phycologia* 36: 395–405.
- Wiencke, C. and M. N. Clayton. 2002. *Antarctic Seaweeds. Synopses of the Antarctic Benthos*. Koeltz Scientific Books, Königstein. pp. 250.
- Wildi, B. and C. Lütz. 1996. Antioxidant composition of selected high alpine plant species from different altitudes. *Plant, Cell Environment* 19: 138–146.

## **Publikation 2**

Poppe, F., Schmidt, R.A.M., Hanelt, D., Wiencke, C.

### **Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae**

Phycological Research 51 (2003) 11 - 19



## Effects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae

Frank Poppe,<sup>1\*</sup> Ralf A. M. Schmidt,<sup>1</sup> Dieter Hanelt<sup>1,2</sup> and Christian Wiencke<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research, Am Handelshafen 12, D-27570 Bremerhaven, Germany and

<sup>2</sup>Biologische Anstalt Helgoland, Kurpromenade, D-27483 Helgoland, Germany

### SUMMARY

The effect of ultraviolet (UV) radiation on the ultrastructure of four red algae, the endemic Antarctic *Palmaria decipiens* (Reinsch) Ricker and *Phycodrys austrogeorgica* Skottsberg, the Arctic-cold temperate *Palmaria palmata* (Linnaeus) O. Kuntze and the cosmopolitan *Bangia atropurpurea* (Roth) C. Agardh was studied. All four species showed a formation of 'inside-out' vesicles from the chloroplast thylakoids upon exposure to artificial UV-radiation. In *P. decipiens*, most vesicles were developed after 8 h and in *P. palmata*, after 48 h of UV exposure. In *B. atropurpurea*, vesiculation of thylakoids was observed after 72 h of UV irradiation. In *Ph. austrogeorgica*, the chloroplast envelope and thylakoid membranes were damaged and the phycobilisomes became detached from the thylakoids after 12 h of UV exposure. Ultraviolet-induced changes in the membrane structure of mitochondria were observed in *P. decipiens* and *P. palmata*. However, in *P. decipiens* they were reversible as was the damage in chloroplast fine structure after 12 h of UV treatment. Protein crystals in *Ph. austrogeorgica* showed degradation after exposure to UV radiation. Different methods of fixation and embedding macroalgal material are discussed. These findings give insight into the fine structural changes which occur during and after UV exposure and indicate a relationship between the species dependent sensitivity to UV-exposure and the depth distribution of the different species.

Key words: macroalgae, protein crystals, Rhodophyta, ultrastructure, UV radiation.

### INTRODUCTION

Since 1979, a marked depletion of the stratospheric ozone layer, especially over Antarctica, has been observed during the early Austral summer leading to an increase in ultraviolet-B (UV-B) radiation at the Earth's surface (Frederick and Snell 1988; Karentz 1994). Although UV-B radiation is more strongly absorbed than photosynthetically active radiation (PAR) even in clear Antarctic waters, biologically relevant irradiances of UV-B radiation may penetrate the water column to

10–30 m at depth (Karentz 1989; Hoyer *et al.* 2001). Therefore, increasing solar UV radiation may be harmful, especially to polar and eulittoral species, which become fully exposed to natural sunlight during low tide (Holm-Hansen *et al.* 1993).

Ultraviolet radiation has been found to affect marine macroalgae in several ways, including effects on photosynthesis, DNA lesions, nitrogen metabolism and growth, as shown in numerous publications reviewed by Franklin and Forster (1997) and Bischof *et al.* (2002). Laboratory investigations have revealed multiple molecular targets of UV radiation, including nucleic acids (Harm 1980), photosynthetically relevant proteins (Vass 1997) and membrane lipids (Murphy 1983). The potentially most vulnerable lipids are those with unsaturated fatty acids that can easily be peroxidized by the action of oxygen radicals produced by UV irradiation impairing membrane stability (Kramer *et al.* 1991).

While the effects of UV radiation on the physiology of algae are relatively well documented, little is known about the influence on the cellular fine structure. Apart from a few investigations on higher plants and microalgae, there has only been one paper published dealing with UV-induced changes in the ultrastructure of the Antarctic red alga *Palmaria decipiens* (Reinsch) Ricker (Poppe *et al.* 2002). The results obtained by Poppe *et al.* (2002) are discussed more broadly in the present study and compared with studies of three other species.

### MATERIALS AND METHODS

#### Plant material

Species used in this experiment are listed in Table 1. After collection, the isolates were kept in stock cultures at the Alfred Wegener Institute (Bremerhaven, Germany). Experimental individuals were raised from stock cultures at 5°C under various light conditions summarized in Table 2. Photosynthetically active radiation (PAR) was provided by daylight-fluorescent tubes (Osram

\*To whom correspondence should be addressed.

Email: fpoppe@awi-bremerhaven.de

Communicating editor: G. H. Kim.

Received 20 April 2002; accepted 30 September 2002.

Table 1. Investigated species and respective vertical distribution

Species	Class	Collecting location	Zonation (reference)
<i>Palmaria decipiens</i> (Reinsch) Ricker	Florideophyceae	King-George-Island (Antarctica)	upper/middle littoral (Wiencke and Clayton 2002)
<i>Palmaria palmata</i> (Linnaeus) O. Kuntze	Florideophyceae	Roscoff (France)	littoral down to 20 m (Bird and McLachlan 1992)
<i>Phycodrys austrogeorgica</i> Skottsberg	Florideophyceae	King-George-Island (Antarctica)	littoral down to 43 m (Wiencke and Clayton 2002)
<i>Bangia atropurpurea</i> (Roth) C. Agardh	Bangiophyceae	Disko-Island (Greenland)	upper littoral down to 8 m (Bird and McLachlan 1992)

Table 2. Exposure conditions

Species	Preculture and recovery light conditions ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	UV exposure (h)	PAR exposure after UV exposure (h)
<i>Palmaria decipiens</i>	25	23	24
<i>Palmaria palmata</i>	25	48	48
<i>Phycodrys austrogeorgica</i>	10	12	24
<i>Bangia atropurpurea</i>	40	96	48

L58/W19, Osram, Berlin, Germany) under 18 h : 6 h light : dark cycles. The cultures were aerated in glass beakers filled with filtered sea water (0.2  $\mu\text{m}$  membrane filters, Sartorius Sartobran, Germany) which was changed every 10 days. The medium was enriched with nutrients after Provasoli as described in Stein (1973).

### UV irradiation conditions

In the experimental treatment, samples were exposed to artificial UV radiation supplied by UVA-340 fluorescent tubes (Q-Panel, Cleveland, USA). Background PAR emitted by additional daylight fluorescent tubes (Osram L58/W19) was adjusted to the respective irradiance in the precultures (see Table 2). Spectral irradiance conditions within the experimental set-ups using different UV irradiances were determined with a Spectro 320 D spectroradiometer (Instrument Systems, Munich, Germany) (see Fig. 1). The integrated irradiances of PAR (400–700 nm), UV-A (320–400 nm) and UV-B (280–320 nm) are summarized in Fig. 1. After the UV treatments, the algae were transferred again to the respective preculture conditions to induce recovery (see Table 2).

### Electron microscopy

Samples were cryofixed by use of a high-pressure freezing machine (HPM 010, Balzers, Liechtenstein) as described by Dahl and Staehelin (1989). Freeze-substitution was performed in an automatic freeze-substitution system (AFS, Reichert, Austria) using two different substitution protocols. In fixation 1, a mixture of dimethoxypropan (DMP) : water free acetone (1 : 2 v/v) with 2% glutaraldehyde (from a 70% stock solution),

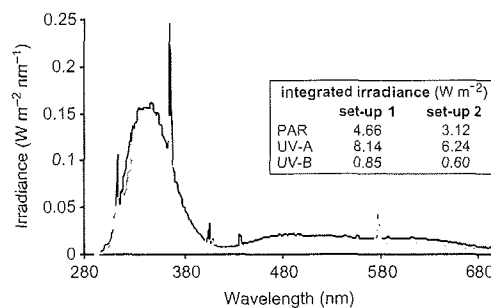
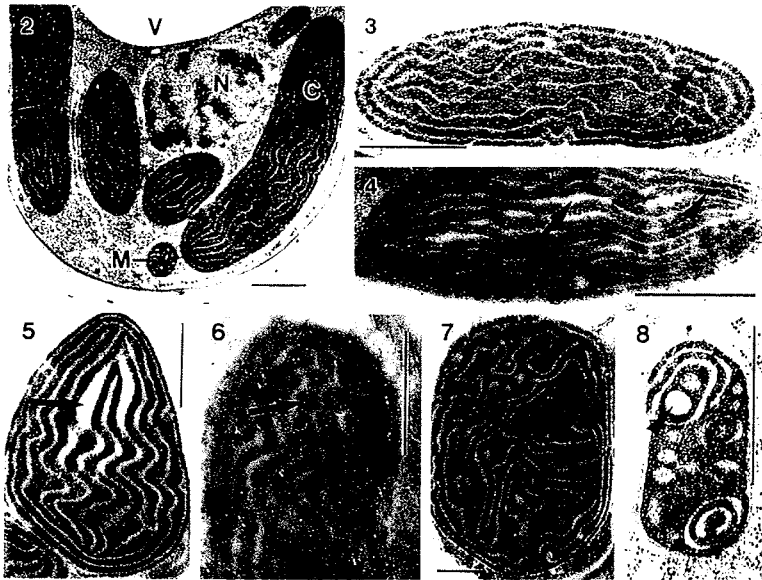


Fig. 1. Spectral irradiance of the UV-range (280–400 nm) and PAR (400–700 nm) emitted by the lamps used in the experiments. (—), set-up 1; (---), set-up 2.

0.6% uranyl acetate (from a 10% stock solution in water-free methanol) and 1.5% osmium tetroxide was used as described by Kaeser (1989). Samples were kept in the medium at  $-75^{\circ}\text{C}$  for 72 h, warmed from  $-75^{\circ}\text{C}$  to  $-60^{\circ}\text{C}$  over 3 h, held at  $-60^{\circ}\text{C}$  for 72 h, warmed from  $-60^{\circ}\text{C}$  to  $-30^{\circ}\text{C}$  over 6 h, held at  $-30^{\circ}\text{C}$  for 24 h. Samples were then washed in DMP : acetone (1 : 2 v/v) for 1 h and in water-free acetone for 1 h and finally warmed to room temperature. In fixation 2, a parallel set of samples was freeze-substituted according to the protocol of Steinbrecht and Müller (1987). Samples were kept in water-free acetone with 0.5% uranyl acetate at  $-90^{\circ}\text{C}$  for 50 h, warmed from  $-90^{\circ}\text{C}$  to  $-60^{\circ}\text{C}$  over 2 h, held at  $-60^{\circ}\text{C}$  in 2% osmium tetroxide in dried acetone for 10 h, warmed from  $-60^{\circ}\text{C}$  to  $-30^{\circ}\text{C}$  in dried acetone for 2 h, held at  $-30^{\circ}\text{C}$  for 10 h and finally warmed to room temperature. Samples were then infiltrated gradually in Araldite



**Figs 2-8.** Effect of ultraviolet (UV) radiation on the fine structure of *P. decipiens*. Scale bars = 1  $\mu\text{m}$ . 2. Fine structure from an UV-untreated specimen with typical chloroplasts and mitochondria (fixation 2). 3. Typical chloroplast fine structure in a UV-untreated individual (fixation 2). Arrowhead points to a phycobilisome. 4. Chloroplast fine structure in a specimen irradiated with UV for 2 h (set-up 2), showing dilated thylakoids (arrow). Arrowhead points to a phycobilisome. 5. Chloroplast fine structure in a specimen irradiated with UV for 4 h (set-up 2), showing dilated thylakoids (arrow). 6. Chloroplast of a specimen irradiated with UV for 6 h (set-up 1) showing formation of 'inside-out' vesicles (arrow) (fixation 1). 7. Chloroplast of a specimen irradiated with UV for 23 h (set-up 2) showing disorganized thylakoid formation (fixation 2). 8. Mitochondrion of a specimen irradiated with UV for 8 h (set-up 2), with cristae enlarged to sacculi (arrowhead) (fixation 2). C, Chloroplast; M, Mitochondrion; N, Nucleus; V, Vacuole.

(fixation 1) (Plano, Germany) or in Spurr's low-viscosity resin (fixation 2) (Spurr 1969) (Plano, Germany) and polymerized 7 days later at 70°C. Sections were cut on an ultramicrotome (ULTRACUT E, Reichert, Austria) using a diamond knife, collected on formvar-carbon coated copper grids and stained with uranyl acetate and Reynolds' lead citrate (Reynolds 1963). The samples were examined in an electron microscope (EM 902, Zeiss, Germany) at 80 kV.

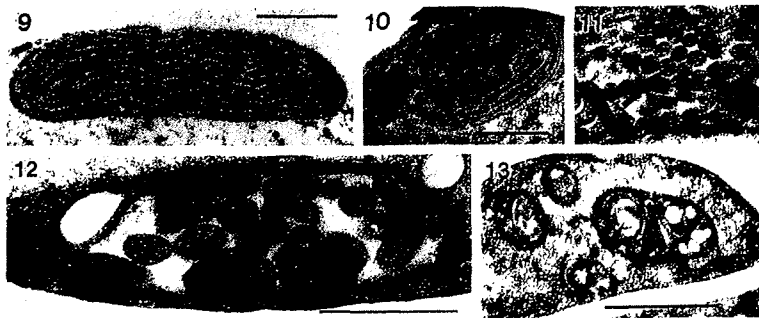
## RESULTS

### *Palmaria decipiens*

UV-untreated cells showed the typical fine structure of florideophyceae cells. The chloroplasts in particular, exhibited the normal pattern of parallel thylakoids and phycobilisomes attached to the outside of the thylakoid membranes (Figs 2,3). In cells from algae irradiated with UV-A + B radiation for 2 h, chloroplast thylakoids appeared dilated (Fig. 4). Moreover, vesicle-like formations at the margin of chloroplasts were observed. After 4 h of UV radiation, these changes were more

pronounced. Figure 5 shows a chloroplast with highly dilated thylakoids. Chloroplasts with vesicle-like appearances were found very rarely. After 6-8 h of UV radiation, pronounced changes in the ultrastructure of chloroplasts were observed (Fig. 6). The chloroplast thylakoids were disrupted and appeared to be connected with vesicles of up to 0.5  $\mu\text{m}$  in diameter. Stroma and phycobilisomes can still clearly be recognized inside the vesicles. These structural changes were predominantly present on the side of the thallus exposed to the UV source, whereas the shaded side was less affected. After 12-23 h of UV exposure, these changes disappeared. No additional vesicles were observed and the phycobilisomes were attached to the protoplasmic surface of the thylakoids. However, the thylakoids exhibited an irregular shape (Fig. 7).

The mitochondria of UV-untreated individuals exhibited a tubuli-type structure (Fig. 2). After 4 h of UV exposure however, the tubuli were swollen and appeared mostly as sacculi (Fig. 8). These changes disappeared after 23 h of UV irradiation. Nuclei, Golgi bodies and endoplasmic reticulum (ER) did not show any conspicuous structural changes upon UV exposure.



**Figs 9–13.** Effect of ultraviolet (UV) radiation on the fine structure of *P. palmata*. Scale bars = 1 µm. 9. Typical chloroplast fine structure in a UV-untreated individual (fixation 1). 10. Chloroplast of a specimen irradiated with UV for 2 h (set-up 1), showing vesiculation of thylakoids (arrow) (fixation 1). 11. Part of a chloroplast from a specimen irradiated with UV for 24 h (set-up 1), showing tubular-like structures formed out of thylakoids (arrow). 12. Chloroplast of a specimen irradiated with UV for 48 h (set-up 1) and subsequent 48 h of low PAR, showing vesiculation of thylakoids (arrow) and highly expanded intrathylakoidal spaces (fixation 1). 13. Mitochondrion of a specimen irradiated with UV for 48 h (set-up 1), with cristae enlarged to sacculi (arrowhead) (fixation 1).

### *Palmaria palmata*

The fine structure of cells from UV-untreated individuals from *P. palmata* resembled that of *P. decipiens* with typical chloroplasts (Fig. 9) and rod-shaped mitochondria with tubular cristae. The first changes in the structure of chloroplasts were detectable after 2 h of UV exposure. Chloroplasts showed a vesiculation of thylakoids (Fig. 10). After 6 h of UV radiation, the vesiculation of the thylakoids increased; vesicles or tubular structures were regularly organized. These changes persisted until 24 h of UV exposure (Fig. 11). After 48 h of UV exposure, these vesicles grew in size and the electron translucent intrathylakoidal space expanded. Under subsequent exposure to white light for another 48 h this tendency was even more strongly pronounced (Fig. 12).

Mitochondria of UV-untreated cells exhibited a tubuli-type structure (data not shown). After 2 h of UV exposure, they appeared to be swollen and the inner mitochondrial membrane was organized in sacculi. These changes are still detectable after 48 h of UV radiation and even after 48 h of exposure to white light only (Fig. 13).

### *Phycodrys austrogeorgica*

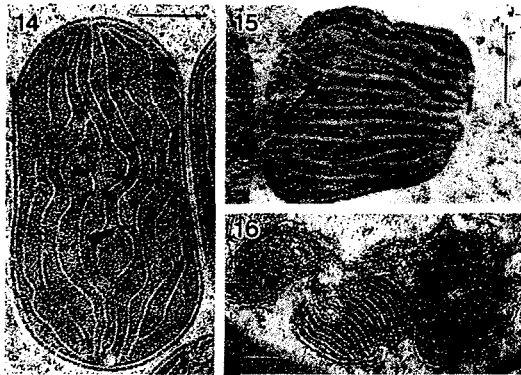
Chloroplasts from UV-untreated individuals from *Ph. austrogeorgica* show the fine structure characteristic for the Florideophyceae with a high number of chloroplasts. The chloroplasts are well preserved with the normal pattern of thylakoids arranged in parallel and phycobilisomes attached to the thylakoid membranes (Fig. 14). After 2–7 h of UV exposure, some chloroplasts showed dilated thylakoids (Fig. 15). A vesiculation of thylakoids with stroma and phycobilisomes inside was detectable occasionally in samples irradiated for 6 h with UV. After 8 h of UV radiation, a disorganized

pattern of thylakoid arrangement could be observed and after 12 h of exposure, there was a visible breakdown of the chloroplast membrane structures. Specifically, phycobilisomes became detached from the thylakoid membranes, and the thylakoids and chloroplast envelope disintegrated (Fig. 16). After 24 h of exposure to white light for recovery, the chloroplasts still appeared damaged (data not shown).

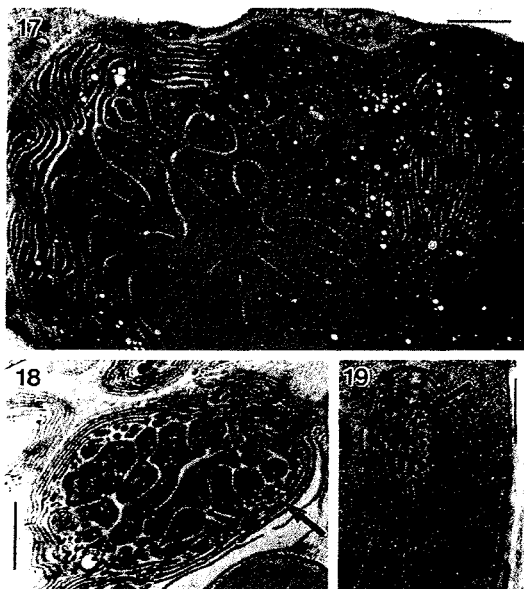
*Ph. austrogeorgica* shows a variety of crystalline, electron-dense inclusions in the cytoplasm. One type consists of a crystalline substructure with no visible surrounding membrane (Fig. 20). After 4 h of UV exposure, these inclusions had a lamellar structure with discontinuities in the crystal matrix (Fig. 21). After 12 h of UV radiation there was a loosening of the lamellar substructure at the periphery of the crystal, as well as internal fracturing (Fig. 22). After re-exposure to PAR, the crystal became further degraded (Fig. 23). Another type of inclusion in the *Ph. austrogeorgica* cytoplasm is characterized by a highly electron-dense material with no visible crystalline substructure (Fig. 24). Under UV exposure, the crystals with a diameter of c. 2 µm break up into several smaller crystals with less electron-dense material around the dark areas (Fig. 25).

### *Bangia atropurpurea*

Control specimen from *B. atropurpurea* showed the typical stellate-shaped chloroplast characteristic for the Bangiophyceae with thylakoids organized in parallel and a central pyrenoid (Fig. 17). After 72 h of UV exposure, this pattern changed into vesicle-like appearances adjacent to the pyrenoid (Fig. 18) and tubularly arranged thylakoids (Fig. 19). In severe cases, these structures grew in size and vesicles of 0.5 µm in diameter were formed (Fig. 18).



**Figs 14–16.** Effect of ultraviolet (UV) radiation on the fine structure of *Ph. austrogeorgica*. Scale bars = 1  $\mu\text{m}$ . 14. Typical chloroplast fine structure in a UV-untreated individual (fixation 2). Arrowhead points to a phycobilisome. 15. Fine structure of a chloroplast in a specimen, irradiated with UV for 4 h (set-up 2), showing dilated thylakoids (arrow) (fixation 2). 16. Chloroplasts from a specimen irradiated with UV for 12 h (set-up 2), showing detached phycobilisomes and a damaged chloroplast envelope (fixation 2).



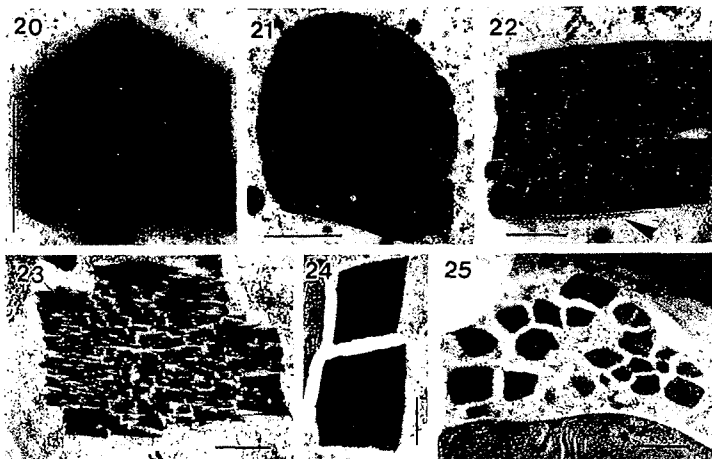
**Figs 17–19.** Effect of ultraviolet (UV) radiation on the fine structure of *B. atropurpurea*. Scale bars = 1  $\mu\text{m}$ . 17. Chloroplast fine structure in a UV-untreated individual (fixation 1). 18. Chloroplast in a specimen irradiated with UV for 72 h (set-up 1), showing vesicles formed out of thylakoids adjacent to the pyrenoid (arrow) (fixation 1). 19. Chloroplast in a specimen irradiated with UV for 72 h (set-up 1), showing tubular thylakoids (arrow) (fixation 1).

## DISCUSSION

### Methodological considerations

The present study showed that cryofixation followed by freeze-substitution is a reliable method to preserve cellular fine structure and phycobilisomes in particular, in red macroalgae. The high pressure freezing method for fixation of subcellular structures with subsequent

freeze-substitution represents the best method to show intact phycobilisomes in red macroalgae, which is a major advantage compared to conventional chemical fixation. Up to now, intact phycobilisomes attached to the thylakoid membrane have been mainly shown in cyanobacteria and unicellular red algae (Gantt and Conti 1967; Van Eykelenburg 1979; Mörschel and Rhiel 1987; Lange *et al.* 1990), they have not been



**Figs 20–25.** Effect of UV radiation on protein crystals of *Ph. austrogeorgica*. Scale bars = 1  $\mu\text{m}$  or as indicated. 20. Protein crystal in an untreated individual showing periodicity of the crystal (fixation 2). Scale bar = 0.5  $\mu\text{m}$ . 21. Protein crystal in a specimen irradiated with UV for 4 h (set-up 2), showing a lamellar substructure and discontinuities in the crystal matrix (arrow) (fixation 2). 22. Protein crystal in a specimen irradiated with UV for 12 h (set-up 2), showing loosening of the lamellar substructure on the edge of the crystal (arrowhead) and a break-up of the whole structure (arrow) (fixation 2). 23. Protein crystal in a specimen irradiated with UV for 12 h (set-up 2) and subsequent recovery in preculture white light conditions for 24 h, showing further degradation of the whole crystal (fixation 2). 24. Protein crystals in a UV-untreated specimen characterized by a highly electron-dense material with no visible crystalline substructure (fixation 1). 25. Protein crystals in a specimen irradiated with UV for 6 h (set-up 1), showing several electron-dense subcrystals in a matrix of more electron-transparent material (fixation 1).

shown well in macroalgae (Waaland *et al.* 1974; Pueschel and van der Meer 1984; Rascio *et al.* 1991; Foltran *et al.* 1996; Talarico 1996; Tsekos *et al.* 1996). In only one other study have the phycobilisomes in the Antarctic red alga *Palmaria decipiens* been well preserved by the use of cryofixation, as in the present study (Poppe *et al.* 2002). Chemical fixation depends on the infiltration time of the fixative, therefore cryofixed biological samples show the native state rather than chemically fixed ones. In many cells, the best preparation for the preservation of cellular ultrastructure is high pressure freezing (Gilkey and Staehelin 1986; Kiss and Staehelin 1995). However, cryofixation followed by freeze-substitution also has its limitations, for example a reduced infiltration of resin and poor membrane contrast (Babuka and Pueschel 1998). In the present study, the problems of poor membrane contrast in cryofixed specimen is evident, although this feature appears to be resin-dependent. Chloroplasts of specimens embedded in Araldite (fixation 1) show a good preservation of phycobilisomes but low membrane contrast, while chloroplasts of specimens embedded in Spurr's resin (fixation 2) or Epon 802 (data not shown) show a slightly better membrane contrast.

### UV effects on ultrastructure

The most striking effect of UV radiation on the fine structure of red algae in this study is the disruption of

the chloroplasts. The formation of 'inside-out' vesicles from the thylakoid membrane occurred in all four species examined and therefore may appear as a general rule for red algal chloroplasts. Moreover, in the extremely sensitive *Ph. austrogeorgica* protein crystals appear corroded under UV radiation indicating either damage or remobilization of the stored protein for repair processes.

From this study, it appears that the chloroplasts are sensitive to UV radiation in red algae. Disruption of thylakoids and the formation of translucent 'inside-out' vesicles with phycobilisomes inside have been previously documented in *Palmaria decipiens* by Poppe *et al.* (2002). Similar vesicles were observed in the pea *Pisum sativum* L. (higher plant) and are thought to be formed from thylakoids after exposure to UV-B radiation (Brandle *et al.* 1977). Complete disruption of the outer double membranes of the chloroplasts was also documented. A general dilation of thylakoids after irradiation of *Beta vulgaris* L. (higher plant) leaves with low UV-B irradiances (290–320 nm, 94.6 mW m<sup>-2</sup>) was reported by Bornmann *et al.* (1983). However, 'inside-out' vesicles were not reported in this species. A disintegration of the grana and a loss of the net-like arrangement was observed in UV-irradiated cells of the unicellular green alga *Micrasterias denticulata* Breb. under unnaturally high UV-B irradiances (UV-B 9 W/m<sup>2</sup>, UV-A 26.8 W/m<sup>2</sup>) (Meindl and Lütz 1996; Lütz *et al.* 1997). It should, however, be mentioned that in

the *Micrasterias* studies a non-natural UV-A:UV-B ratio of 3 : 1 was applied, which differs significantly from the natural ratios observed in the field of about 20 : 1. The UV-B irradiance applied in the present study (0.6 W/m<sup>2</sup>) corresponds more closely to the field conditions observed in Antarctica during summer (Hoyer *et al.* 2001).

The fine structural changes shown in the present study, especially the formation of the 'inside-out' vesicles may have functional implications. Physiologically, it would be difficult to establish a proton gradient across the thylakoid membrane and consequently, photosynthetic reactions will be impaired. Other reported UV-induced changes include depolarization of the membrane potential, net leakage of Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> and differences in ATPase activity in cell membranes (Doughty and Hope 1973; Murphy 1983; Gallo *et al.* 1989) and in thylakoid membranes (Iwanzik *et al.* 1983; Chow *et al.* 1992; Hideg and Vass 1996). These changes in ion-permeability of the thylakoid membranes take place within a few hours of UV-B exposure, and should therefore be taken into account when considering the results of the present study. Furthermore, it has been found that UV radiation leads to a depletion of unsaturated fatty acids in membranes through lipid peroxidation, therefore decreasing the unsaturated/saturated fatty acid ratio and impairing membrane stability (Kramer *et al.* 1991). In the worst cases, whole chloroplasts are disrupted as shown in the present study of *Ph. austrogeorgica*. This high level of damage reflects the extreme sensitivity of the chloroplasts of this sublittoral species, fitting well with studies on photosynthetic performance after UV exposure in the same species (Bischof *et al.* 1998). In contrast to *P. decipiens*, maximum quantum yield in *Ph. austrogeorgica* is not able to recover in 24 h white light after exposure to 12 h of UV stress (data not shown). The extreme UV sensitivity of this species may be related to the fact that *Ph. austrogeorgica* has no capability for biosynthesis of sun-screens such as mycosporine-like amino acids (MAA) (Hoyer *et al.* 2001) which have been shown to be important as UV-absorbing compounds in red algae (Karentz *et al.* 1991). Under the low UV levels in the sublittoral, this species is able to survive and reproduce. However, if UV levels increase, this study suggests that the survival of this species at these depths is not possible.

*Ph. austrogeorgica* is regarded as the species most sensitive to UV radiation in the present study. The other three species, all growing in more exposed habitats, react to UV radiation with strong vesiculation in the chloroplasts. However, they are less sensitive to UV radiation than *Ph. austrogeorgica* and do not show a total breakdown of chloroplast fine structure or a leakage of phycobilisomes. One reason for the difference in sensitivity may be the high concentrations of MAA in both *Palmaria* species (Karsten *et al.* 1998; Karsten and

Wiencke 1999; Hoyer *et al.* 2001) and the even higher MAA concentration in *Bangia atropurpurea* (Karsten and West 2000).

The reformation of an almost normal thylakoid structure as shown in *P. decipiens* seems to indicate an acclimation process to UV radiation. This interpretation is supported by the fact that after 16 h of UV treatment, maximum quantum yield was restored when *P. decipiens* was cultivated for 24 h in white light (Poppe *et al.* 2002). In *P. palmata* however, thylakoid vesicles did not disappear after 48 h UV exposure, indicating that this species has a higher sensitivity to UV radiation. However, in comparison with the deep-water species *Ph. austrogeorgica*, *P. palmata* is still more resistant to UV as there was no detachment of phycobilisomes seen in *Palmaria* species from shallow waters.

Ultraviolet-induced changes in the structure of mitochondria similar to those observed in *P. decipiens* and *P. palmata* in the present study (changes from tubuli to sacculi type structure), have also been documented in higher plants (Lichtscheidl-Schultz 1985; Santos *et al.* 1993). Physiologically, these findings may have functional implications, although Aguilera *et al.* (1999) showed a low sensitivity of respiration to UV radiation in various species including *Palmaria palmata*.

Another fine structural aspect shown here is the sensitivity of protein crystals to UV radiation. Protein crystals are protein storage pools which are mobilized under nitrogen limitations (Pueschel 1992). The present study shows for the first time that two types of protein crystals in *Ph. austrogeorgica* are either damaged by UV radiation, or that the protein is remobilized and used for repair processes. Proteins are known to be strong absorbers of UV-B radiation (Karentz 1994) and an increased protein degradation followed by resynthesis in order to replace UV-B sensitive proteins could thus be expected during UV-B exposure (Cullen and Neale 1994). Repair-mechanisms for UV-B induced damage of membranes or electron transport components demand increased enzymatic activity with higher nitrogen requirements. For example, photosynthetically relevant proteins like ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) or D1 protein show an increased turnover under UV exposure, leading to a decrease in photosynthetic activity (Aro *et al.* 1993; Bornmann and Teramura 1993; Strid *et al.* 1994). Moreover, it has been shown that UV-B can directly affect the nitrogen uptake system in phytoplankton and leads to decreased uptake rates of ammonium and nitrate (Döhler 1992; Behrenfeld *et al.* 1995). Therefore, one function of protein crystals may be the storage of nitrogen and this may provide a buffer against the limiting factor of a UV-induced nitrogen deficit.

The present study on ultrastructural changes confirms the correlation between the species dependent

sensitivity towards UV-exposure and the respective vertical distribution of species on shore. Further ozone depletion and the related increase in UV radiation on the Earth's surface is regarded as a threat to macroalgae growing in the deeper sublittoral, as these species lack protection from harmful UV radiation.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Deutsche Forschungsgemeinschaft for their financial support. We are also grateful to Kai Bischof and Monica Schoenwaelder for critically reading the manuscript.

## REFERENCES

- Aguilera, J., Karsten, U. and Lippert, H. 1999. Effects of solar radiation on growth, photosynthesis and respiration of marine macroalgae from the Arctic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **191**: 109–19.
- Aro, E. M., Virgin, I. and Andersson, B. 1993. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**: 113–34.
- Babuka, S. J. and Poeschel, C. M. 1998. A freeze-substitution ultrastructural study of the cytoskeleton of the red alga *Antithamnion kyllinii* (Ceramiales). *Phycologia* **37**: 251–8.
- Behrenfeld, M. J., Lean, D. R. S. and Lee, H. I. I. 1995. Ultraviolet-B radiation effects on inorganic nitrogen uptake by natural assemblages of oceanic plankton. *J. Phycol.* **31**: 25–36.
- Bird, C. J. and McLachlan, J. L. 1992. *Seaweed Flora of the Maritimes. I. Rhodophyta – the Red Algae*. Biopress, Bristol, 177 pp.
- Bischof, K., Hanelt, D. and Wiencke, C. 1998. UV-radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. *Mar. Biol.* **131**: 597–605.
- Bischof, K., Hanelt, D. and Wiencke, C. 2002. UV-radiation and Arctic marine macroalgae. In Hessen, D. (Ed.) *UV Radiation and Arctic Ecosystems*. Springer, New York, pp. 227–43.
- Bornmann, J. F., Evert, R. F. and Mierzwa, R. J. 1983. The effect of UV-B and UV-C radiation on sugar beet leaves. *Protoplasma* **117**: 7–16.
- Bornmann, J. F. and Teramura, A. H. 1993. Effects of ultraviolet-B radiation on terrestrial plants. In Young, A. R. (Ed.) *Environmental UV Photobiology*. Plenum Press, New York, pp. 427–71.
- Brandle, J. R., Campbell, W. F., Sisson, W. B. and Caldwell, M. M. 1977. Net photosynthesis, electron transport capacity, and ultrastructure of *Pisum sativum* L. exposed to ultraviolet-B radiation. *Plant Physiol.* **60**: 165–9.
- Chow, W. S., Strid, A. and Anderson, J. M. 1992. Short-term treatment of pea plants with supplementary Ultraviolet-B radiation: Recovery time-courses of some photosynthetic functions and components. In Murata, N. (Ed.) *Research in Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 361–4.
- Cullen, J. J. and Neale, P. J. 1994. Ultraviolet radiation, ozone depletion, and marine photosynthesis. *Photosyn. Res.* **39**: 303–20.
- Dahl, R. and Staehelin, L. A. 1989. High-pressure freezing for the preservation of biological structure: theory and practice. *J. Electron Microsc. Techn.* **13**: 165–74.
- Döhler, G. 1992. Impact of UV-B radiation on uptake of <sup>15</sup>N-ammonia and <sup>15</sup>N-nitrate by phytoplankton of the Wadden Sea. *Mar. Biol.* **112**: 485–9.
- Doughty, C. J. and Hope, A. B. 1973. Effects of ultraviolet radiation on the membranes of *Chara corallina*. *J. Membr. Biol.* **13**: 185–98.
- Foltran, A., Maranzana, G., Rascio, N., Scarabel, L., Talarico, L. and Andreoli, C. 1996. *Iridea Cordata* from Antarctica: an ultrastructural, cytochemical and pigment study. *Bot. Mar.* **39**: 533–41.
- Franklin, L. A. and Forster, R. M. 1997. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *Eur. J. Phycol.* **32**: 207–32.
- Frederick, J. E. and Snell, H. E. 1988. Ultraviolet Radiation Levels During the Antarctic Spring. *Science* **241**: 438–40.
- Gallo, R. L., Kochevar, I. E. and Granstein, R. D. 1989. Ultraviolet radiation induces a change in cell membrane potential *in vitro*: a possible signal for ultraviolet radiation induced alteration in cell activity. *Photochem. Photobiol.* **49**: 655–62.
- Gantt, E. and Conti, S. F. 1967. Phycobiliprotein localization in algae. *Energy Conversion by the Photosynthetic Apparatus. Report of Symposium Held. Brookhaven National Laboratory, Upton, New York*, pp. 393–405.
- Gilkey, J. C. and Staehelin, L. A. 1986. Advances in Ultrarapid Freezing for the Preservation of Cellular Ultrastructure. *J. Electron Microsc. Techn.* **3**: 177–210.
- Harm, W. 1980. *Biological Effects of Ultraviolet Radiation*. Cambridge University Press, Cambridge, 216 pp.
- Hideg, E. and Vass, I. 1996. UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. *Plant Sci.* **115**: 251–60.
- Holm-Hansen, O., Helbling, E. W. and Lubin, D. 1993. Ultraviolet radiation in Antarctica: Inhibition of primary production. *Photochem. Photobiol.* **58**: 567–70.
- Hoyer, K., Karsten, U., Sawall, T. and Wiencke, C. 2001. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **211**: 117–29.
- Iwanzik, W., Tevini, M. and Dohnt, G. 1983. Action of UV-B radiation on photosynthetic primary reactions in spinach chloroplasts. *Physiol. Plant.* **58**: 401–7.
- Kaesler, W. 1989. Freeze-substitution of plant tissues with a new medium containing dimethoxypropane. *J. Microsc.* **154**: 273–8.
- Karentz, D. 1989. Report on studies related to the ecological implications of ozone depletion on the Antarctic environment. *Antarctic J. United States* **24**: 175–6.



- Karentz, D. 1994. Ultraviolet tolerance mechanisms in antarctic marine organisms. In Weiler, C. S. and Penhale, P. A. (Eds) *Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects*. American Geophysical Union, Washington, D.C., pp. 93–110.
- Karentz, D., McEuen, F. S., Land, M. C. and Dunlap, W. C. 1991. Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Mar. Biol.* **108**: 157–66.
- Karsten, U., Sawall, T. and Hanelt, D. 1998. An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino-acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. *Bot. Mar.* **41**: 443–53.
- Karsten, U. and West, J. A. 2000. Living in the intertidal zone – seasonal effects on heterosides and sun-screen compounds in the red alga *Bangia atropurpurea* (Bangiales). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **254**: 221–34.
- Karsten, U. and Wiencke, C. 1999. Factors controlling the formation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Palmaria palmata* from Spitsbergen (Norway). *J. Plant Physiol.* **155**: 407–15.
- Kiss, J. Z. and Staehelin, L. A. 1995. High pressure freezing. In Severs, N. J. and Shotton, D. M. (Eds) *Rapid Freezing, Freeze Fracture and Deep Etching*. Wiley-Liss, Somerset, NJ, pp. 89–104.
- Kramer, G. F., Norman, H. A., Krizek, D. T. and Mirecki, R. M. 1991. Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry* **30**: 2101–8.
- Lange, W., Wilhelm, C., Wehrmeyer, W. and Mörschel, E. 1990. The supramolecular structure of photosystem II-phycobilisome-complexes of *Porphyridium cruentum*. *Bot. Acta* **103**: 250–7.
- Lichtscheidl-Schultz, I. 1985. Effects of UV-C and UV-B on cytomorphology and water permeability of inner epidermal cells of *Allium cepa*. *Physiol. Plant.* **63**: 269–76.
- Lütz, C., Seidlitz, H. K. and Meindl, U. 1997. Physiological and structural changes in the chloroplast of the green alga *Micrasterias denticulata* induced by UV-B simulation. *Plant Ecol.* **128**: 54–64.
- Meindl, U. and Lütz, C. 1996. Effects of UV irradiation on cell development and ultrastructure of the green alga *Micrasterias*. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* **36**: 285–92.
- Mörschel, E. and Rhiel, E. 1987. Phycobilisomes and thylakoids: The light-harvesting system of cyanobacteria and red algae. In Harris, J. R. and Horne, R. W. (Eds) *Membranous Structures*. Academic Press, London, pp. 210–54.
- Murphy, T. M. 1983. Membranes as targets of ultraviolet radiation. *Physiol. Plant.* **58**: 381–8.
- Poppe, F., Hanelt, D. and Wiencke, C. 2002. Changes in ultrastructure, photosynthetic activity and pigments in the Antarctic Red Alga *Palmaria decipiens* during acclimation to UV radiation. *Bot. Mar.* **45**: 253–61.
- Pueschel, C. M. 1992. An ultrastructural survey of the diversity of crystalline, proteinaceous inclusions in red algal cells. *Phycologia* **31**: 489–99.
- Pueschel, C. M. and van der Meer, J. P. 1984. Ultrastructural characterization of a pigment mutant of the red alga *Palmaria palmata*. *Can. J. Bot.* **62**: 1101–7.
- Rascio, N., Mariani, P., Dalla Vecchia, F. and Trevisan, R. 1991. The vegetative thallus of *Pterocladia capillacea* (Gelidiales, Rhodophyta) I. An ultrastructural and cytochemical study. *Bot. Mar.* **34**: 177–85.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**: 208–12.
- Santos, I., Almeida, J. M. and Salema, R. 1993. Plants of *Zea mays* L. developed under enhanced UV-B radiation. I. Some ultrastructural and biochemical aspects. *J. Plant Physiol.* **141**: 450–6.
- Spurr, A. R. 1969. A Low-Viscosity Epoxy Resin Embedding Medium for Electron Microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**: 31–43.
- Stein, J. R. 1973. *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, 448 pp.
- Steinbrecht, R. A. and Müller, M. 1987. Freeze-substitution and freeze-drying. In Steinbrecht, R. A. and Zierold, K. (Eds) *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 149–72.
- Strid, A., Chow, W. S. and Anderson, J. M. 1994. UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynth. Res.* **39**: 475–89.
- Talarico, L. 1996. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. *Sci. Mar.* **60**: 205–22.
- Tsekos, I., Reiss, H.-D., Orfanidis, S. and Orogas, N. 1996. Ultrastructure and supramolecular organization of photosynthetic membranes of some marine red algae. *New Phytol.* **133**: 543–51.
- Van Eykelenburg, C. 1979. The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity. *Antonie Van Leeuwenhoek – J. Microbiol. Serol.* **45**: 369–90.
- Vass, I. 1997. Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. In Pessaraki, M. (Ed.) *Handbook of Photosynthesis*. Marcel Dekker, New York, pp. 931–49.
- Waaland, J. R., Waaland, S. D. and Bates, G. 1974. Chloroplast structure and pigment composition in the red alga *Griffithsia pacifica*: regulation by light intensity. *J. Phycol.* **10**: 193–9.
- Wiencke, C. and Clayton, M. N. 2002. Antarctic seaweeds. In Wägle, J. W. (Ed.) *Synopses of the Antarctic Benthos*. A.R.G. Gantner Verlag, Ruggell/Lichtenstein 239 pp.

### **Publikation 3**

Poppe, F., John, U., Hanelt, D., Wiencke, C.

### **The effect of UV radiation on *psbA* and *rbcL* gene expression in the Antarctic Red Alga *Palmaria decipiens***

Journal of European Phycology (submitted)

**The effect of UV radiation on psbA and rbcL gene expression  
in the Antarctic Red Alga Palmaria decipiens (Rhodophyta)**

Poppe, F. <sup>\*1</sup>, U. John <sup>1</sup>, D. Hanelt <sup>1,2</sup>, C. Wiencke <sup>1</sup>

1. Alfred Wegener Institute, Am Handelshafen 12, D-27570 Bremerhaven,  
Germany
2. Alfred Wegener Institute, Biologische Anstalt Helgoland, PF 180, D-27483  
Helgoland, Germany

\*Corresponding author:

Tel.: +49-471-4831-1540

Fax: +49-471-4831-1425

E-mail: [fpoppe@awi-bremerhaven.de](mailto:fpoppe@awi-bremerhaven.de)

Alfred Wegener Institute, Am Handelshafen 12, D-27570 Bremerhaven,  
Germany

Running title: Effect of UV radiation on gene expression in the Antarctic Red  
Alga Palmaria decipiens

## Abstract

This is the first publication on the effects of UV radiation on the regulation of photosynthesis in macroalgae. Transcription of D1 protein of PS II and Rubisco in the red alga Palmaria decipiens was investigated with Northern experiments. The chloroplast-encoded psbA and rbcL RNA transcript levels have been determined in samples exposed to moderate UV-B irradiance ( $0.54 \text{ W m}^{-2}$ ) in a daily time series and to higher UV-B irradiance ( $0.97 \text{ W m}^{-2}$ ) over the course of 11 days. Transcript levels of psbA were higher, compared to the white light control in the beginning, and at the end of the daily course. RbcL transcripts were only enhanced after 1 and 2 hours with levels below the white light control from 4 to 16 hours of exposure. In the long-term experiment, psbA showed an initial drop in the transcript level, followed by a rise of up to 400 % of the control after 11 days of UV exposure. In the first 3 days of this experiment, rbcL transcripts were reduced to levels below the control, followed by an increase to 180 % of the control level. These results suggest that UV radiation effects a transcriptional regulation of photosynthesis in Palmaria decipiens.

**Key words:** gene expression, psbA, rbcL, Palmaria decipiens, Rhodophyta, UV radiation

## Introduction

Since 1979, marked depletions of the stratospheric ozone layer (especially over Antarctica) have been observed during early Austral summer leading to a temporary increase in ultraviolet-B radiation at the Earth's surface (Frederick & Snell, 1988; Karentz, 1994). Although UV-B radiation (UVBR) is more strongly absorbed as photosynthetically active radiation (PAR), even in clear Antarctic waters, biologically relevant irradiances of UVBR penetrate into the water column down to 10 – 30 m depth (Karentz, 1989; Hoyer *et al.*, 2001). Therefore, an increase in solar UVBR can harm polar and especially eulittoral species when exposed to natural sunlight during low tide (Holm-Hansen *et al.*, 1993). Laboratory investigations have revealed that UVBR has multiple molecular targets, including membrane lipids (Murphy, 1983), photosynthetically relevant proteins (Vass, 1997) and nucleic acids (Harm, 1980). Thus, it affects the algal photosynthetic process and nitrogen metabolism, causes DNA lesions and finally reduces growth, as reviewed by Franklin & Forster (1997) and Bischof *et al.* (2001). Additionally, UVBR causes clear effects in algal ultrastructure, especially in chloroplasts and mitochondria (Poppe *et al.*, 2002). Recent studies on UV effects in higher plants demonstrated that some of the observed changes may be based on changes in expression of genes encoding key photosynthetic proteins. Transcripts encoding photosynthesis-related proteins were significantly reduced by UVBR (Strid *et al.*, 1994; Jordan, 1996; A.-H.-Mackerness & Jordan, 1999). These authors demonstrated that reactive oxygen species are a component in the signal transduction pathway leading to the down-regulation of gene expression in response to UVBR. In contrast, cyanobacteria react to moderate doses of UVBR with increased levels of *psbA* transcripts encoding the D1 reaction centre subunit of photosystem II (PS II; Campbell *et al.*, 1998; Máté *et al.*, 1998). During irradiation, the D1 protein turns over rapidly and is replaced by newly synthesized polypeptides in the so-called PS II repair cycle (Barber *et al.*, 1997). Under environmental stress, the repair cycle itself can be impaired, so that degradation and loss of D1 protein exceeds the rate of replacement (Aro *et al.*, 1993). This net loss of functional D1 leads to a drop in PS II function and therefore contributes to photoinhibition, a high light-caused drop in the quantum yield of photosynthesis. Although photoinhibition of photosynthesis in macroalgae under UV stress has been well demonstrated, no study has yet focussed on gene expression.

In this study, the two important RNA transcript levels of photosynthesis, *psbA* of the chloroplast-encoded D1 protein of the PS II reaction centre complex and *rbcL* of the chloroplast-encoded ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase large subunit (Rubisco), the key enzyme of carbon dioxide fixation were investigated. The red Antarctic macroalga *Palmaria decipiens* was subjected to moderate UV irradiances in a time series during one day comparable to normal conditions in Antarctica, and in a long-term experiment with higher UV irradiances over several days simulating extreme conditions of stratospheric ozone depletion at middays in austral summer.

## Materials and Methods

### Plant material

Palmaria decipiens (Reinsch) Ricker was originally isolated on King-George-Island (Antarctica) and kept in stock-cultures in the Alfred Wegener Institute (Bremerhaven, Germany). Male gametophytes raised from stock-cultures were cultivated at 5 °C and 20  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  provided by daylight-fluorescent tubes (Osram L58/W19) under a 18 h light:6 h dark cycle. The cultures were aerated in glass vessels filled with nutrient enriched Provasoli E.S. medium (Stein, 1973) filtered sea water (0.2  $\mu\text{m}$  membrane filters, Sartorius Sartobran) which was changed every 10 days.

### UV irradiation conditions and general experimental set-up

In the experimental treatment, samples were exposed to artificial UV radiation supplied by UVA-340 fluorescent tubes (Q-Panel, USA). Photosynthetically active radiation (PAR) was supplied by daylight fluorescent tubes (Osram L58/W19). Spectral irradiance of the experimental set-up was measured with a Spectro 320 D spectroradiometer (Instrument Systems, Germany) (Fig. 1). The irradiances integrated over different wavebands are summarized in Table 1. A cut-off filter GG 400 (Schott, Germany) was used to exclude UV-A+B radiation in the control experiment. In experiment 1, thalli were exposed to 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16 h of white light (control) followed by 3 h of darkness and for the same intervals with supplementary UV-A+B. In experiment 2, thalli were exposed to 1, 8 and 16 h, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10 and 11 days of white light (control) and supplementary UV-A+B under a 18 h light:6 h dark cycle. Samples from 2 to 11 days were taken at the end of the respective exposure periods. Each sample was collected from five plants, randomly chosen, and pooled, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80$  °C for further investigations. RNA was isolated from thalli grown with/without UVR supplemented to PAR during a time series of one day (low UV) and during a long-time experiment of 11 days (high UV). Aliquots of total RNA were subjected to northern blot analysis with either psbA or rbcl gene sequences, respectively (see below).

### Purification of total RNA

Samples (ca. 0.4 g fresh weight) were homogenized by grinding in liquid nitrogen with quartz sand. The homogenates were dissolved in peqGOLD RNAPure (peqlab, Germany). The phase separation was carried out with chloroform (12000 g, 60 min) and the aqueous phase was then mixed with isopropanol and centrifuged at 12000 g for 30 min. The RNA pellets were washed twice in 70 % ethanol, dried and resuspended in peqGOLD OptiPure (peqlab, Germany) followed by 0.5 % SDS (pH 7) and chloroform. After centrifugation at 3000 g, the aqueous phase was mixed with isopropanol/0.2 M sodium acetate (pH 5). The precipitated RNA was quantified with the BIOPhotometer (Eppendorf, Germany). Absorbances were measured at 230, 260, 280 and 320 nm.

## Electrophoresis, Northern blotting and hybridization

RNA was separated on 1.5 % agarose-formaldehyde gels containing 18 % (v/v) formaldehyde and transferred to a positively charged nylon membrane (Boehringer, Germany) by capillary blotting. Following transfer, the RNA was crosslinked to the nylon membrane by 90 s UV irradiation. The filters were prehybridized for 2 h and then hybridized for 16 h at 40 °C with fragments of the psbA and rbcl cDNA which had been digoxigenin-labelled before. Washing of nylon filters was carried out twice for 5 min at room temperature in 0.5 x SSC containing 0.1 % SDS and twice for 15 min at 60 °C in 0.1 x SSC containing 0.1 % SDS. Autoradiographies of the filters were carried out with Hyperfilm MP (Amersham, UK). The degree of hybridization to each psbA and rbcl transcript was determined directly from the filters by using a GS-700 Imaging Densitometer (Bio-Rad, Germany) and quantified relatively to the amount of ethidiumbromid-stained 28S RNA in the agarose-formaldehyde gel by using a Fluor-S Multi Imager (Bio-Rad, Germany). Values are given as percentage transcripts from UV-treated samples compared to the transcripts from the respective control samples. Values are calculated from the means of three Northern blots.

## DNA sequences

DNA was extracted by grinding *P. decipiens* (200 mg) in liquid nitrogen with quartz sand using 3 % CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) following the procedure of Doyle and Doyle (1990). Extracted DNA was analyzed and quantified with the BIOPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 230, 260, 280, and 320 nm and its integrity was tested on a 1 % agarose gel. Amplification procedure was performed using polymerase chain reaction (PCR). In order to amplify the specific DNA-molecules, a Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) was used. For the amplification of the Photosystem II core 32 kDa protein degenerate primers were used (PsbA forward: 5'-GT(AGCT) GA(CT) AT(CT) GA(CT) GG(AGCT) AT-3', PsbA reverse: 5'-TG(AG) TT(GG) AA(AG) TT(AG) AA(AGCT) CC(AG) TT-3') and for Rubisco LSU primers (Rbcl forward: 5'-TAA CAG CTT GTG ATC TAT ATA GAG C-3', Rbcl reverse: 5'-ACA TTT GCT GTT GGA GTC TC-3') were designed and used according to the *Palmaria palmata* Rubisco LSU sequence (PPU28421). The PCR reaction mix contained 1 µl of DNA (100 ng), 85 µl of water, 10 µl 10 x Tag DNA polymerase buffer (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany), 1 µl 10 mM dNTPs (Hybaid/Interactiva, Heidelberg, Germany), 1 µl forward primer (100 pmol/µl), 1 µl reverse primer (100 pmol/µl) and 1 µl Tag DNA polymerase (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). Amplification was performed with an initial denaturation of 94 °C for 2 min. During the following 35 cycles the denaturation temperature was 94 °C for 30 s, annealing temperature was held for 30 s at 54 °C, and the elongation temperature was 72 °C for 60 s. Finally, elongation was performed at 72 °C for 4 min. The amplicons were 943 and 684 bp long for psbA and rbcl, respectively. The resulting bands of the PCR products were cut out of the agarose gel and purified with DNA purification Kit Easy Pure (Biozym, Hessisch Oldendorf, Germany). Thereafter, PCR products were cloned with a TOPO XL

PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). Ten clones of each cloning approach were picked randomly and the plasmids were purified using Miniprep Plasmid DNA Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). The Plasmids were analyzed through restriction digestion at 37 °C over night with following enzyme mix containing 1 unit per enzyme: HindIII, SstI, EcoRI, PstI, EcoRV, XhoI and XbaI (Gibco-BRL/Life-Technology, Karlsruhe, Germany). Clones belonging to different restriction patterns were sent out for sequencing. The resulting sequences psbA (AJ431702) and rbcl (AJ431701) were proofed using BLAST search and showed 99 % homology to Palmaria palmata for psbA (PPU28165) and 96 % for rbcl (PPU28421), respectively. The plasmids containing psbA or rbcl were chosen as templates to generate digoxigenin (DIG) labeled probes. Therefore, the PCR Dig Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany) was applied following the instruction of the manufacturers and M13 primers from the beforementioned cloning kit were used with the PCR conditions described above.

## Results

Autoradiographs of Northern-blot analysis of total RNA at four times of the one day exposure are shown in Fig. 2. Under white light control conditions (PAR), mRNA transcripts for psbA remained constant until 10 hours of exposure and then declined to a minimum level after 16 hours of exposure. With UV exposure, psbA transcripts even increased after 16 hours and remain high also in the dark. Transcript levels of rbcl under PAR followed a similar pattern as for psbA. Under UV stress, however, rbcl shows a minimum of the transcript level after 10 hours of exposure. The standardised means of 3 measurements presenting the total kinetics with samples taken every two hours are shown in Fig. 3, presenting the change in the transcript levels during one day. After one and two hours of exposure to low UV irradiance, the psbA transcripts increase to about 200 % compared to the control without UV. Thereafter, transcript levels declined to approximate the control levels, whereas after 14 and 16 hours of UV treatment, psbA levels increased to about 215 and 320 % of the control, respectively. After a subsequent 3 hours period of darkness, psbA levels declined again to 155 % of the control. The rbcl transcripts also showed an increase to 324 % after the first hour of UV treatment. In the subsequent time course, rbcl transcripts declined to levels below the control, whereas both levels were similar to the control after 16 hours of UV treatment and 3 hours of darkness, respectively.

Autoradiographs of four timepoints during the long-term experiment with high UV irradiance are shown in Fig. 4. Under white light conditions, psbA transcripts are maximal after 3 days (72 hours) of exposure, followed by a decline, while under UV exposure transcript levels increased constantly until the end of the experiment. Transcripts for rbcl show a different pattern, and declined until 7 days of white light and showed a maximum at the end of the experiment. Under UV exposure however, transcript levels of rbcl were constantly at a low level until 7 days (168 hours) but with a maximum at the end. The standardised means of the long-term experiment as percentage of the respective controls are shown in Fig. 5. In the beginning of the experiment, both psbA and rbcl transcripts were reduced to about 70 % of the white light control. Thereafter,



psbA transcript levels increased to about 140 % and rose from 8 days (192 hours) even further to more than 400 % by the end. In contrast, up until 3 days of UV treatment, rbcL transcripts show transcript levels less than 100 % and increased to about 150 % with exception of the 10<sup>th</sup> day, above the 100 % control level.

Both of the time series samples were measured after 1, 8 and 16 hours of UV treatment so that a comparison between the different UV-irradiances was possible (Fig 6 and 7). After 1 and 8 hours of low UV treatment psbA transcript levels were 191 respectively 168 % of the control, whereas they increased to 320 % after 16 hours. In the high UV treatment, however, psbA showed at first a decline to 66 %, followed by a rise to about 150 % after 8 and 16 hours of UV exposure. Transcript levels of rbcL show a different pattern. After 1 hour of low UV treatment, the level increased at first to more than 300 % of the control and fall to 71 % and 123 % after 8 and 16 hours of treatment, respectively. In the high UV treatment, rbcL transcripts fall to 72 % after 1 hour and further to 50 % after 8 and 16 hours of UV exposure.

## Discussion

To our knowledge, this is the first study of the effect of UV radiation on gene expression of chloroplast proteins in macroalgae. The results show different reaction patterns of the two transcripts to UV exposure. Initially, under low UV radiation levels there is a temporary increase of both psbA and rbcL transcripts. Differences in gene expression are detectable after 8 hours of exposure, with psbA transcript levels significantly higher than the rbcL transcript levels (see Fig. 3). The specific molecular mechanisms which may be involved in the differences in transcript levels (i.e. transcription rate, RNA stability, translation, etc.) cannot be deduced from the present study. However, a rapid increase of transcripts in the first hour of UV exposure may indicate an increased requirement of D1 protein and Rubisco after the dark period. Such diurnal fluctuations in photosynthetic gene expression have also been reported in light-dark cycles for cyanobacteria and higher plants (Piechulla & Gruissem, 1987; Colón-López & Sherman, 1998; Reddy *et al.*, 2000). Furthermore, short-term changes in light conditions, i.e. changes from low to high light are known to result in significant increases of psbA transcription and mRNA stability (Constant *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1999). After a long period of high light stress, there is an inverse correlation between psbA transcription and psbA mRNA stability, as the transcription rate decreases. This was also observed under dark conditions (Mohamed & Jansson, 1991).

The turn-over rate of the D1 protein is about two orders of magnitude greater than any other protein within the chloroplast (Mattoo *et al.*, 1984). As UV-B exposure enhances both the rate of synthesis and degradation of the D1 polypeptide (Greenberg *et al.*, 1989), it is likely that psbA transcripts increase after 14 and 16 hours of UVR in order to increase D1 protein synthesis, which then replaces damaged D1 in PS II reaction centres. Moreover, the mRNA transcript for the psbA gene is very stable under UV-B exposure (Strid *et al.*, 1994). Consequently, the results of the low UV-experiment lead to the suggestion, that after 14 and 16 hours of UV exposure the regulation of the D1 protein may also occur at the transcription level. In Pisum sativum (Jordan *et*

al., 1991; A.-H.-Mackerness *et al.*, 1997; A.-H.-Mackerness *et al.*, 1998; A.-H.-Mackerness *et al.*, 1999) and *Arabidopsis thaliana* (Jordan *et al.*, 1998; John *et al.*, 2001), *psbA* transcripts are reported to be reduced by UVBR, whereas in cyanobacteria, similar conditions lead to an increase in *psbA* transcript levels (Campbell *et al.*, 1998; Máté *et al.*, 1998). Moreover, Máté *et al.* (1998) found an increase in turn-over rates of the D1 and D2 reaction centre subunits of PS II under UV exposure, thus, replacing damaged protein by newly synthesized polypeptides.

In *P. decipiens* after 8 hours of low UV exposure, *rbcl* transcript levels are significantly lower than those of *psbA*, and are reduced as compared to the control. This may be due to either no need for synthesis of new Rubisco, or alternatively UV-induced damage to DNA and the transcriptional apparatus, or a specific response to UVR at the level of the RNA stability. Rubisco seems to be one of the important targets of UVR as its quantity and activity decrease under UV exposure (Bischof *et al.*, 2000). After 16 hours of UV exposure, the level was approximately the same as in the control, suggesting possible acclimation mechanisms. This could be accomplished by the production of UV-absorbing compounds (mycosporine-like amino acids, MAA) in red algae (Karentz *et al.*, 1991; Post & Larkum, 1993; Hoyer *et al.*, 2001). *P. decipiens* is capable of producing MAAs after 8 hours at similar UV exposure (data not shown). After 3 hours in darkness, the *rbcl* transcripts were still on the same level, whereas *psbA* transcripts drop back down to the control level. This may reflect the high turn-over rate of the D1 protein in contrast to the slower Rubisco turn-over and suggests that the control loop is still functioning. Although we performed no study on Rubisco concentration or activity, these parameters are known to decline under UV radiation in the Rhodophyta *Palmaria palmata* as well as *Pisum sativum* (Jordan *et al.*, 1992; Bischof *et al.*, 2002). These studies were able to show that the decrease in Rubisco polypeptides is relatively slow compared to the more rapid decrease in *rbcl* transcripts, suggesting an effect upon transcription of the genome. This would agree with our findings, that *rbcl* transcripts are reduced after 8 hours of low UV exposure.

In the long-term high UV-experiment, differences between *psbA* and *rbcl* transcript levels are detectable up until 72 hours and then again after 192 hours of UV exposure. Compared to control levels, *psbA* transcripts are always higher than *rbcl* transcripts. After 8 hours of UVR, *psbA* levels are higher than control levels throughout the experiment leading to the suggestion of an enhanced production of D1 to cope with impaired PS II reaction centres with the result of a transcriptional regulation. Transcript levels of *rbcl*, however, are lower than control levels until 96 hours of UV exposure, possibly as a consequence of an impaired transcriptional apparatus, UV-damaged mRNA or no need of Rubisco due to impaired photosynthesis. Later on, the levels increased and were similar to control levels, indicating acclimation or activation of repair mechanisms. Like *psbA*, *rbcl* transcripts are reported to decrease under supplementary UVBR in higher plants, although to a higher degree (Jordan *et al.*, 1992; A.-H.-Mackerness *et al.*, 1997; Jordan *et al.*, 1998; A.-H.-Mackerness *et al.*, 1999). This is comparable to our studies in the first hours of UV radiation, where *rbcl* transcripts rise and later decrease to lower values than the control. Moreover, in the long-term experiment, plants showed a decrease in phycobilin pigments from the fourth day of UV treatment whereas chlorophyll *a* concentrations did not change throughout the experiment (data not shown).

Comparing low and high irradiances after 1, 8 and 16 hours of exposure, transcript levels of psbA show significant differences after 1 and 16 hours, where high UVR causes clearly lower transcript levels. Already after 1 hour of high UVR, a decrease in psbA transcripts were measured, compared to the control. In case of rbcL, all transcript levels were reduced significantly at high UV compared to the control. In conclusion, these results show that the psbA transcript level does react more directly to UV exposure as the rbcL level. The greater increase of the psbA transcripts during prolonged and higher UV exposure indicates the necessity to repair damaged reaction centers. However, Rubisco might also be affected, so that a change of the transcription rate is necessary. However, these processes can be overlaid if the transcription and translation processes are itself affected by UV radiation.

### Acknowledgments

We are indebted to Dr. Linda Medlin for providing laboratory facilities and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ha 1818/3) for financial support. We thank Dr. Monica Schoenwaelder and Dr. Klaus-Ulrich Valentin for critically reading of this manuscript and Thomas Mock as well as Alexander Lüdeking for helpful advice in the laboratory.

### References

- A.-H.-MACKERNESS, S. JORDAN, B.R. (1999). Changes in gene expression in response to ultraviolet B-induced stress. In Handbook of Plant and Crop Stress (Pessarakli, M., editor), 749-768. Marcel Dekker, New York.
- A.-H.-MACKERNESS, S. JORDAN, B.R. THOMAS, B. (1999). Reactive oxygen species in the regulation of photosynthetic genes by ultraviolet-B radiation (UV-B: 280-320 nm) in green and etiolated buds of pea (Pisum sativum L.). J. Photochem. Photobiol., B: Biol., **48**: 180-188.
- A.-H.-MACKERNESS, S. SURPLUS, S.L. JORDAN, B.R. THOMAS, B. (1998). Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthetic transcripts at different stages of leaf development and light levels in pea (Pisum sativum L.): Role of active oxygen species and antioxidant enzymes. Photochem. Photobiol., **68**: 88-96.
- A.-H.-MACKERNESS, S. THOMAS, B. JORDAN, B.R. (1997). The effect of supplementary ultraviolet-B radiation on mRNA transcripts, translation and stability of chloroplast proteins and pigment formation in Pisum sativum L. J. Exp. Bot., **48**: 729-738.
- ARO, E.M. VIRGIN, I. ANDERSSON, B. (1993). Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. Biochim. Biophys. Acta, **1143**: 113-134.
- BARBER, J. NIELD, J. MORRIS, E.P. ZHELEVA, D. HANKAMER, B. (1997). The structure, function and dynamics of photosystem two. Physiol. Plant., **100**: 817-827.
- BISCHOF, K. HANELT, D. WIENCKE, C. (2002). UV-radiation and Arctic marine macroalgae. In UV radiation and Arctic Ecosystems. Ecological Studies Series (Hessen, D., editor), 227-243. Springer, New York.

- BISCHOF, K. HANELT, D. WIENCKE, C. (2000). Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. Planta, **211**: 555-562.
- CAMPBELL, D. ERIKSSON, M.-J. ÖQUIST, G. GUSTAFFSON, P. CLARKE, A.K. (1998). The cyanobacterium Synechococcus resist UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**: 364-369.
- CHEN, Y.-B. DOMINIC, B. ZANI, S. MELLON, M.T. ZEHR, J.P. (1999). Expression of photosynthesis genes in relation to nitrogen fixation in the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium Trichodesmium sp. IMS 101. Plant Mol. Biol., **41**: 89-104.
- COLÓN-LÓPEZ, M.S. SHERMAN, L.A. (1998). Transcriptional and translational regulation of photosystem I and II genes in light-dark- and continuous-light-grown cultures of the unicellular cyanobacterium Cyanothece sp. strain ATCC 51142. J. Bacteriol., **180**: 519-526.
- CONSTANT, S. PEREWOSKA, I. ALFONSO, M. KIRILOVSKY, D. (1997). Expression of the psbA gene during photoinhibition and recovery in Synechocystis PCC 6714: inhibition and damage of transcriptional and translational machinery prevent the restoration of photosystem II activity. Plant Mol. Biol., **34**: 1-13.
- DOYLE, J.J. DOYLE J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, **12**: 13-15.
- FRANKLIN, L.A. FORSTER, R.M. (1997). The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. Eur. J. Phycol., **32**: 207-232.
- FREDERICK, J.E. SNELL, H.E. (1988). Ultraviolet Radiation Levels During the Antarctic Spring. Science, **241**: 438-440.
- GREENBERG, B.M. GABA, V. CANAANI, O. MALKIN, S. MATTOO, A.K. EDELMANN, M. (1989). Separate photosensitizers mediate degradation of the 32 kDa-photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**: 6617-6620.
- HARM, W. (1980). Biological effects of ultraviolet radiation. Cambridge University Press, Cambridge.
- HOLM-HANSEN, O. HELBLING, E.W. LUBIN, D. (1993). Ultraviolet radiation in Antarctica: Inhibition of primary production. Photochem. Photobiol., **58**: 567-570.
- HOYER, K. KARSTEN, U. SAWALL, T. WIENCKE, C. (2001). Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. Mar. Ecol. Prog. Ser., **211**: 117-129.
- JOHN, C.F. MORRIS, K. JORDAN, B.R. THOMAS, B. A.-H.-MACKERNESS, S. (2001). Ultraviolet-B exposure leads to up-regulation of senescence-associated genes in Arabidopsis thaliana. J. Exp. Bot., **52**: 1367-1373.
- JORDAN, B.R. (1996). The effects of UV-B radiation on plants: a molecular prospective. In Advances in Botanical Research (Callow, J.A., editor), 97-162. Academic Press, New York.
- JORDAN, B.R. CHOW, W.S. STRID, A. ANDERSON, J.M. (1991). Reduction in cab and psbA RNA transcripts in response to supplementary ultraviolet-B radiation. FEBS Letters, **284**: 5-8.
- JORDAN, B.R. HE, J., CHOW, W.S. ANDERSON, J.M. (1992). Changes in

- mRNA levels and polypeptide subunits of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in response to supplementary ultraviolet-B radiation. Plant, Cell and Environment, **15**: 91-98.
- JORDAN, B.R. JAMES, P.E. A.-H.-MACKERNESS, S. (1998). Factors affecting UV-B-induced changes in Arabidopsis thaliana L. gene expression: the role of development, protective pigments and the chloroplast signal. Plant Cell Physiol., **39**: 769-778.
- KARENTZ, D. (1989). Report on studies related to the ecological implications of ozone depletion on the Antarctic environment. Antarctic Journal of the United States, **24**: 175-176.
- KARENTZ, D. (1994). Ultraviolet tolerance mechanisms in antarctic marine organisms. In Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects. (Weiler, C.S. Penhale, P.A., editors), 93-110. American Geophysical Union, Washington, D.C..
- KARENTZ, D. MC EUEN, F.S. LAND, M.C. DUNLAP, W.C. (1991). Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. Mar. Biol., **108**: 157-166.
- MÁTÉ, Z. SASS, L. SZEKERES, M. VASS, I. NAGY, F. (1998). UV-B induced differential transcription of psbA genes encoding the D1 protein of photosystem II in the cyanobacterium Synechocystis 6803. J. Biol. Chem., **273**: 17439-17444.
- MATTOO, A.K. HOFFMAN-FALK, H. MARDER, J.B. EDELMANN, M. (1984). Regulation of protein metabolism: coupling of photosynthetic electron transport to *in vivo* degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**: 1380-1384.
- MOHAMED, A. JANSSON, C. (1991). Photosynthetic electron transport controls degradation but not production of psbA transcripts in the cyanobacterium Synechocystis 6803. Plant Mol. Biol., **16**: 891-897.
- MURPHY, T.M. (1983). Membranes as targets of ultraviolet radiation. Physiol. Plant., **58**: 381-388.
- PIECHULLA, B. GRUISSEM, W. (1987). Diurnal mRNA fluctuations of nuclear and plastid genes in developing tomato fruits. EMBO J., **6**: 3593-3599.
- POPPE, F. HANELT, D. WIENCKE, C. (2002). Changes in ultrastructure, photosynthetic activity and pigments in the Antarctic red alga Palmaria decipiens during acclimation to UV Radiation. Bot. Mar., **45**: 253-261.
- POST, A. LARKUM, A.W.D. (1993). UV-absorbing pigments, photosynthesis and UV exposure in Antarctica: comparison of terrestrial and marine algae. Aquat. Bot., **45**: 231-243.
- REDDY, M.S. NAITHANI, S. TULI, R. SANE, P.V. (2000). Diurnal regulation of plastid genes in Populus deltoides. Indian J. Biochem. Biophys., **37**: 453-458.
- STEIN, J.R. (1973). Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge.
- STRID, A. CHOW, W.S. ANDERSON, J.M. (1994). UV-B damage and protection at the molecular level in plants. Photosynthesis Research, **39**: 475-489.
- VASS, I. (1997). Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. In Handbook of Photosynthesis. (Pessaraki, M., editor), 931-949. Marcel Dekker, New York.

Table1: Irradiances applied in both experiments

Fig. 1: Spectral irradiance of the UV range (280-400 nm) and PAR (400-700 nm) emitted by the lamps used in the experiments.

Fig. 2: Autoradiographs of Northern-blot analysis of total RNA from *P. decipiens* in the daily course. The RNA was isolated from control plants (PAR) or those exposed to supplementary UV-A+B radiation (UV) for up to 16 hours and another 3 hours in darkness.

Fig. 3: Quantitative changes in *psbA* and *rbcL* transcripts in the daily course. Northern blots, probed with cDNA probes, were quantified by using a GS-700 Imaging Densitometer (Bio-Rad, Germany) and quantified relative to the amount of ethidiumbromid-stained 28S RNA in the agarose-formaldehyde gel by using a Fluor-S Multi Imager (Bio-Rad, Germany). Values are presented as percentage transcripts from UV-treated plants as compared to transcripts from respective control plants, which are represented by the black 100 % line. Values are calculated from results of three Northern blots.

Fig. 4: Autoradiographs of Northern-blot analysis of total RNA from *P. decipiens* in the long-term experiment. The RNA was isolated from control plants (PAR) or those exposed to supplementary UV-A+B radiation (UV) for up to 11 days (264 hours).

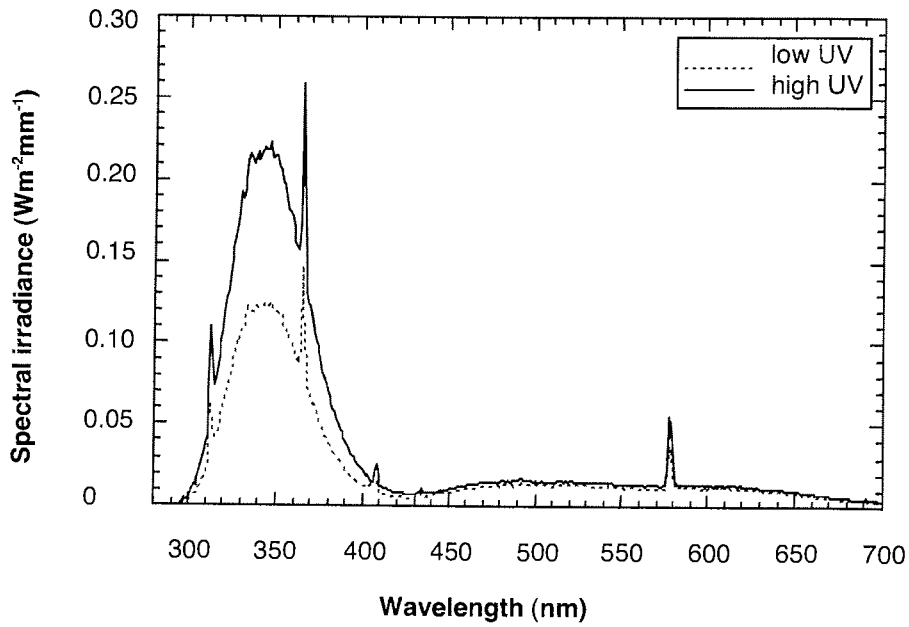
Fig. 5: Quantitative changes in *psbA* and *rbcL* transcripts in the long-term experiment. Northern blots, probed with cDNA probes, were quantified by using a GS-700 Imaging Densitometer (Bio-Rad, Germany) and quantified relative to the amount of ethidiumbromid-stained 28S RNA in the agarose-formaldehyde gel by using a Fluor-S Multi Imager (Bio-Rad, Germany). Values are presented as percentage transcripts from UV-treated plants as compared to transcripts from respective control plants, which are represented by the black 100 % line. Values are calculated from results of three Northern blots.

Fig. 6: Quantification of *psbA* transcripts under low and high UV doses. Values are presented as percentage transcripts from UV-treated plants as compared to transcripts from respective control plants, which are represented by the black 100 % line. Values are calculated from results of three Northern blots.

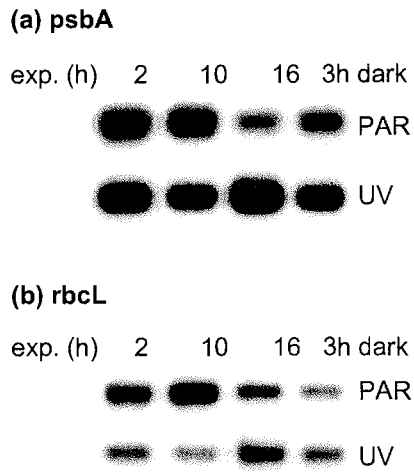
Fig. 7: Quantification of *rbcL* transcripts under low and high UV doses. Values are presented as percentage transcripts from UV-treated plants as compared to transcripts from respective control plants, which are represented by the black 100 % line. Values are calculated from results of three Northern blots.

**Table 1.**

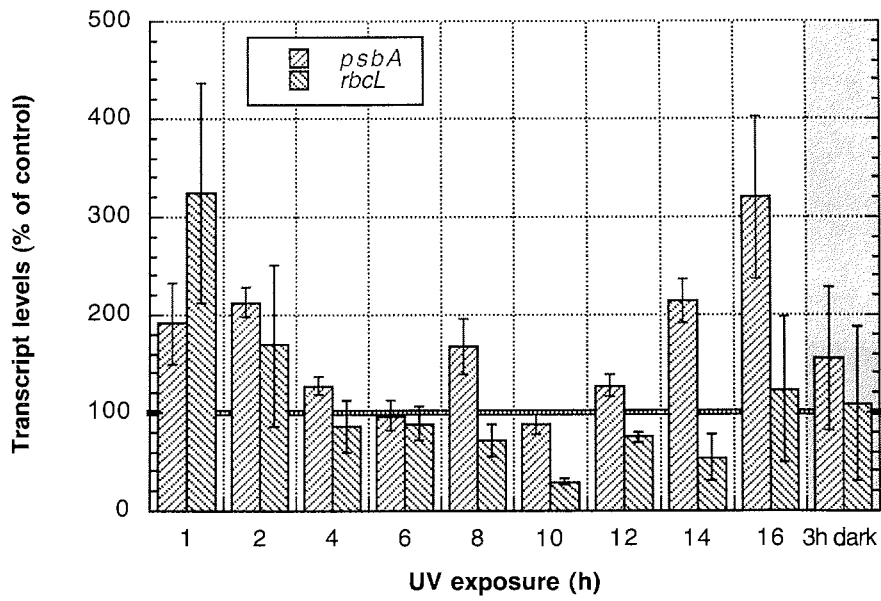
waveband (nm)	UV-B ( $W m^{-2}$ )	UV-A ( $W m^{-2}$ )	PAR ( $W m^{-2}$ )
low UV	0.54	6.28	3.14
high UV	0.97	11.11	3.77



**Fig. 1 Poppe**



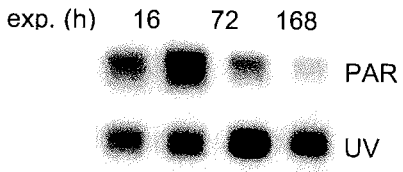
**Fig. 2 Poppe**



**Fig. 3 Poppe**



(a)



(b) *rbcL*

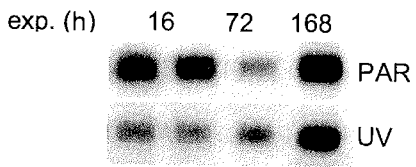


Fig. 4 Poppe

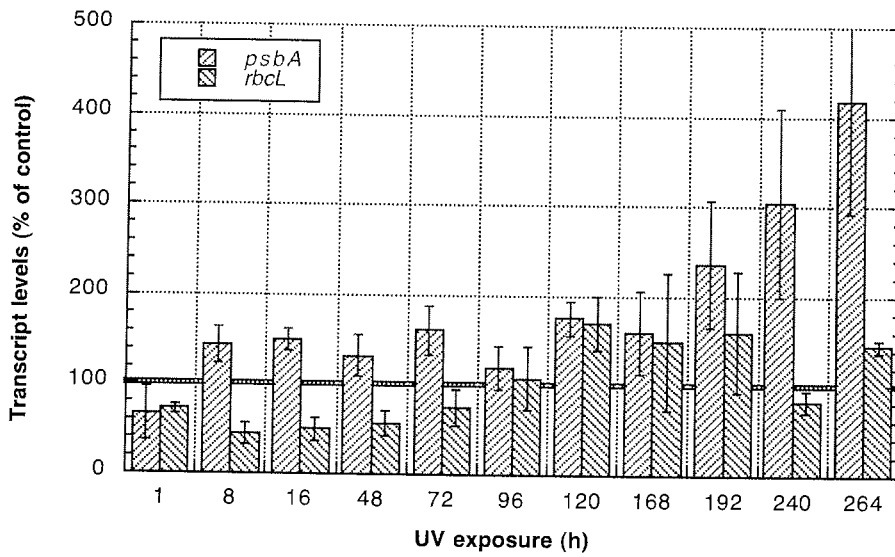


Fig. 5 Poppe

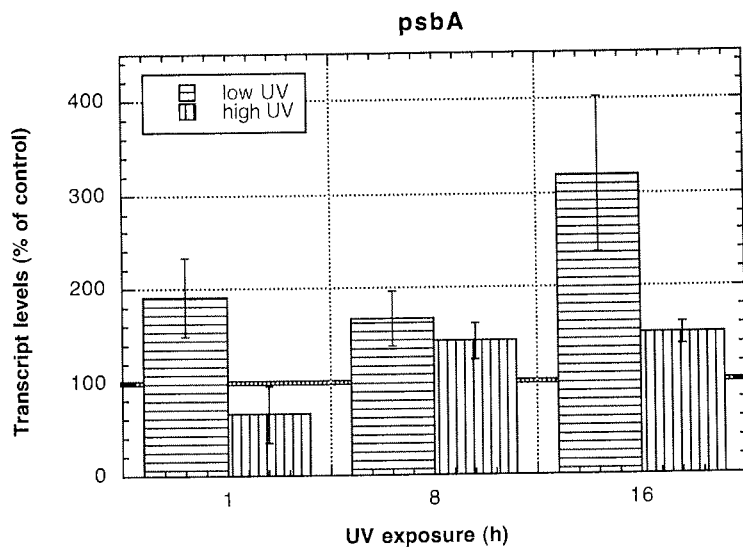


Fig. 6 Poppe

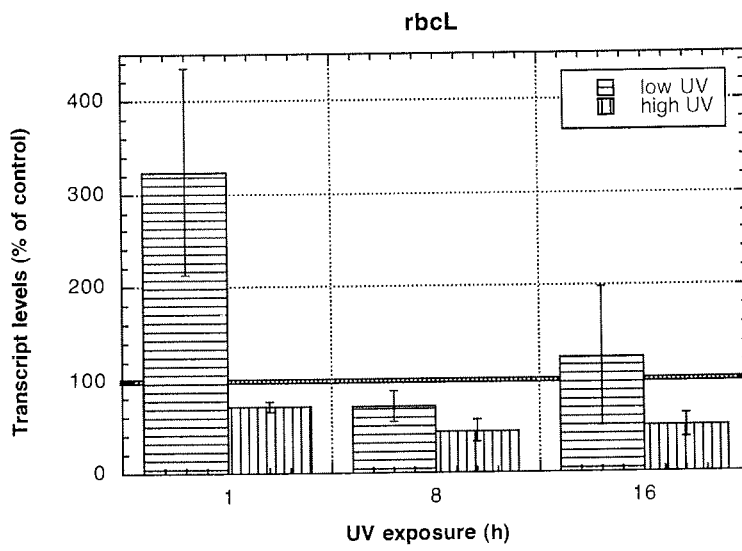


Fig. 7 Poppe

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Pflanzenmaterial

Als Pflanzenmaterial dienten Algen aus der Kulturensammlung des Alfred-Wegener-Instituts (Bremerhaven). Tetrasporen von *Palmaria decipiens* (Reinsch) Ricker wurden auf King George Island (Antarktis) isoliert und als Stammkultur im Alfred-Wegener-Institut gehältert (Kultur-Nr. 2042). Aus dieser Stammkultur wurden bei 5°C und 25  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  männliche Gametophyten herangezogen. *Phycodrys austrogeorgica* Skottsberg wurde ursprünglich ebenfalls auf King George Island (Antarktis) isoliert und als Stammkultur im Alfred-Wegener-Institut gehältert (Kultur-Nr. 2127). Aus der Stammkultur wurden bei 5°C und 10  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  Gametophyten angezogen. Als Lichtquelle dienten Tageslicht-Fluoreszenzröhren (Osram L58/W19) mit einem Licht:Dunkel-Rhythmus von 18:6 h. Die Messung der Strahlungsintensitäten erfolgte mit dem Li-189 Quantameter (Li-Cor, Lincoln, USA) und dem dazugehörigen cos-Sensor. Die Algen wurden in gefiltertem Nordseewasser (0.2  $\mu\text{m}$  Membranfilter, Sartorius Sartobran) kultiviert und durchgehend belüftet. Das Medium wurde nach Provasoli mit Nährstoffen angereichert (Stein, 1973) und wöchentlich gewechselt.

*Palmaria decipiens* gehört zur Klasse der Florideophyceae und zur Ordnung der Palmariales. Diese, in der Antarktis endemische Art ist zirkumpolar verbreitet und wächst bevorzugt im oberen Sublitoral, jedoch auch bis in Tiefen von 15-40 m (Ricker, 1987; Zielinski, 1990; Lamb und Zimmermann, 1998; Wiencke und Clayton, 2002). Sie kann zudem in Bereichen des Eulitorals vorkommen, dort jedoch nur in geschützten Gezeitentümpeln bzw. in Felsspalten (Klöser et al., 1996). *Phycodrys austrogeorgica* gehört ebenfalls zur Klasse der Florideophyceae, ist aber der Ordnung der Ceramiales zugeordnet. Die Art wächst vom oberen Sublitoral bis in Tiefen von 43 m, in geringen Tiefen aber bevorzugt im Unterwuchs (Wiencke und Clayton, 2002). Rotalgen wurden ausgewählt, da sie meistens deutlich stärker auf UV-Stress reagieren als Braun- oder Grünalgen. Dabei ist *P. decipiens* im oberen Sublitoral höherer UV-Strahlung ausgesetzt als *Ph. austrogeorgica*, die im mittleren bis unteren Sublitoral nur mit geringen Bestrahlungsstärken konfrontiert wird.

#### 3.2 UV- und PAR-Bestrahlung

Neben den Weißlicht-Fluoreszenzröhren wurden zur Erzeugung der UV-Strahlung Fluoreszenzröhren des Typs UVA-340 (Q-Panel, Cleveland, USA) verwendet. Deren Emissionsspektrum unterhalb von 340 nm ist dem der Sonne sehr ähnlich. Das Spektrum der verwendeten Röhren wurde mit dem Spektrometer Spectro 320 D (Instrument Systems, München) gemessen (Publikation 1, Abb. 1; Publikation 2, Abb. 1; Publikation 3, Tabelle 1 und Abb. 1). Da in den Versuchen Starklichteffekte vermieden werden sollten, wurden keine zusätzlichen Weißlichtquellen verwendet, so daß das Spektrum nur eine hohe Intensität im UV-Bereich zeigt, während die Bestrahlungsstärke im PAR-Bereich verhältnismäßig niedrig war (16 – 25  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bei *P. decipiens* und 10  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bei *Ph. austrogeorgica*). Eine Ausnahme sind die Arbeiten in Publikation 1, in denen zusätzlich der Starklichteffekt (500  $\mu\text{mol Pho}$

tonen  $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ , Maxispot-T 50W, Osram, Deutschland) auf die Photosyntheseaktivität und Pigmentkonzentrationen von *P. decipiens* untersucht wurde.

### 3.3 Elektronenmikroskopie

Um Algenmaterial für die Elektronenmikroskopie zu präparieren, müssen die einzelnen Schritte ausreichend optimiert werden. Zunächst unterscheidet man zwischen einer konventionellen chemischen Fixierung und der Hochdruck-Cryofixierung mit anschließender Gefriersubstitution. Bei der chemischen Fixierung hängt die Qualität der Ergebnisse u. a. von der Infiltrationszeit der chemischen Fixanten und der Beschaffenheit des zu fixierenden Gewebes ab. Hier stellen vor allem die Zellwände der Rotalgen ein Problem dar. In dieser Arbeit wurden mehrere Varianten der chemischen Fixierung ausprobiert. Als Fixanten wurden 6 % Glutaraldehyd (GA, Vorfixierung) (Plano, Wetzlar) und 1 % Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ , Nachfixierung) (Plano, Wetzlar) jeweils in 0,1 M Natrium-Cacodylat-Puffer (pH 6,9; angesetzt in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  oder Seewasser) (Plano, Wetzlar) gelöst, verwendet. Fixierungszeiten waren bei Glutaraldehyd 2 bis 31 h, bei Osmiumtetroxid 1 h. Zwischen der Vor- und Nachfixierung wurden die Proben in obigem Puffer für 4 bis 26 h mit viermaligem Mediumwechsel, nach der Sekundärfixierung im gleichen Puffer für bis zu 19 h mit dreimaligem Mediumwechsel gewaschen. Die nachfolgende Entwässerung erfolgte entweder mit Ethanol (Merck, Darmstadt) oder Aceton (Merck, Darmstadt) in 10minütigen 3 %-Schritten. Als letzte, vollständige Entwässerung wurde bei der Ethanol-Entwässerung Propylenoxid (Merck, Darmstadt), bei der Aceton-Entwässerung mittels Molekularsieb (0,5 nm; Merck, Darmstadt) getrocknetes Aceton eingesetzt. Daraufhin wurden die mit Ethanol/Propylenoxid entwässerten Proben mit Araldit (Plano, Wetzlar) infiltriert, indem über 24 Stunden bei geschlossenem Deckel tropfenweise Araldit zugegeben wurde, bis das Verhältnis Propylenoxid:Araldit 1:1 war. Danach wurden die Deckel der Probengefäße geöffnet, so daß das Lösungsmittel verdampfen konnte und so graduell eine Harzkonzentration von 100 % hergestellt wurde. Die Proben verblieben bei täglichem Wechsel weitere 3 Tage in jeweils frisch angesetztem Araldit und wurden daraufhin für 2 Tage bei  $50^\circ\text{C}$  auspolymerisiert. Die mit Aceton entwässerten Proben wurden mit Spurr's Medium (Spurr, 1969) (Plano, Wetzlar) infiltriert, wobei die Harzkonzentration täglich um 10 % erhöht wurde. Zuletzt blieben die Proben für 4 Tage in 100 % Spurr und wurden für 8 h bei  $70^\circ\text{C}$  ausgehärtet.

Eine verbesserte Methode, um die Ultrastruktur von Rotalgen darzustellen, bietet die Cryofixierung mit anschließender Gefriersubstitution. Dabei wurde das Hochdruck-Gefriergerät HPM 010 (Balzers, Liechtenstein) verwendet. Durch die Ausnutzung des Hochdruckeffektes lassen sich Proben bis zu einer Dicke von 0,5 mm ohne Zugabe von Gefrierschutzmitteln einfrieren, so daß möglichst feinkörniges (mikrokristallines) bzw. amorphes Eis erzeugt wird (Moor, 1987; Dahl und Staehelin, 1989; Studer et al., 1989). Ziel des Einfrierens der biologischen Proben mit dem Hochdruck-Gefriergerät ist es, in den wässrigen Zellen nur mikrokristallines oder sogar amorphes Eis zu erzeugen und sie so im vitrifizierten Zustand optimal zu fixieren. Im Einfrierprozeß dürfen keine hexagonalen Makroeiskristalle erzeugt werden, die die Strukturen zerstören würden. Die dafür notwendigen Einfriereraten dürfen dabei unter atmosphärischen Druckver-

hältnissen von 1 bar nicht kleiner als 10000°C/s sein (Moor, 1987). Bei einem Druck von 2100 bar wird der Gefrierpunkt des Wassers jedoch von 0 auf -22°C erniedrigt. Gleichzeitig wird der Beginn homogener Nukleation (Unterkühlbarkeit) des Wassers, welcher unter Normalbedingungen bei -40°C liegt, durch den hohen Druck auf -90°C gesenkt (Bachmann und Mayer, 1987) und das Wasser kristallisiert nicht zu „Eis I“ mit geringer Dichte, sondern es bildet sich „Eis II und III“ mit sehr hohen Dichten (Franks, 1982). Aufgrund der somit 1500 mal höheren Viskosität des Wassers wird die Keimbildungs- und die Kristallwachstumsrate stark reduziert, und die extrem hohen Einfrierraten von mindestens 10000°C/s sind unter diesen Bedingungen unnötig.

Das zurechtgeschnittene Präparat (max. 3 mm Ø und 2 µm Dicke) wird zum Hochdruckgefrieren zwischen zwei Trägerplättchen aus Aluminium (Balzers, Liechtenstein) eingeschlossen. Zur Vermeidung von Luftschlüssen und zum optimalen Transfer von Druck und Kälte werden Lücken mit 1-Hexadecen (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) ausgefüllt, einem hydrophoben Paraffinöl mit geringer Viskosität und Oberflächenspannung (Studer et al., 1989). Nach einer Zeitverzögerung von 15 ms wird flüssiger Stickstoff (LN<sub>2</sub>) unter einem Druck von ca. 2100 bar auf die Oberflächen des „Präparatsandwiches“ geschossen. Diese Abkühlung des „Sandwiches“ auf -150°C wird vom Gerät kontrolliert, und der Temperatur- und Druckverlauf kann für jeden Einfriervorgang mit einem Schreiber ausgedruckt werden (Abb. 1). Der Transfer in einen bereitstehenden LN<sub>2</sub>-Behälter dauert nicht länger als 2-3 s, wobei die Präparattemperatur unter -140°C bleibt (Moor, 1987). Das „Präparatsandwich“ wird dem Präparathalter in LN<sub>2</sub> entnommen und kann in einem LN<sub>2</sub>-Lager-Dewar aufbewahrt werden.

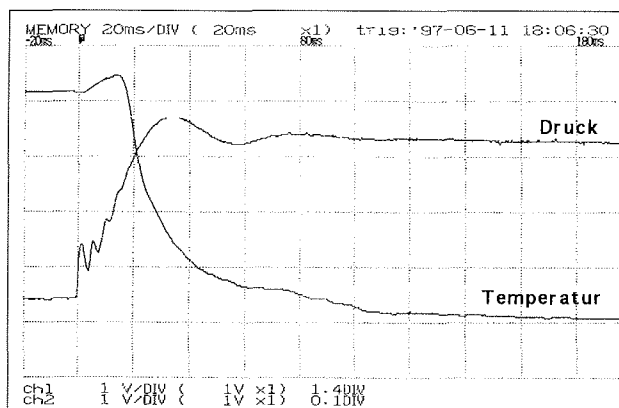


Abb. 1: Druck- und Temperaturkurven eines Fixierungsvorganges mit der HPM. Während der Druck von 1 bar (Umgebungsdruck der Atmosphäre) auf 2000 bar aufgebaut wird, sinkt die Temperatur von Raumtemperatur auf -150°C ab.

Nach erfolgreicher Cryofixierung erfolgt die Gefriersubstitution, in der das Wasser durch ein Lösungsmittel (wahlweise mit Fixantien) ersetzt wird. Zu dieser Entwässerung der Proben wurde das „Automatische System zur Gefriersubstitution“ (AFS) von Reichert (Wien, Österreich) benutzt. Entscheidend ist, daß zu keinem Zeitpunkt Eiskristalle entstehen, die Zellstrukturen zerstören könnten. Die AFS erlaubt dem Benutzer durch Stickstoffkühlung die Kontrolle einer bestimmten Temperatur und eines definierten Temperaturanstiegs. Zudem hält sie die Proben fern von atmosphärischer Luftfeuchtigkeit. Als Substitutionsmedium

wurden zwei Varianten verwendet. Das Medium nach Kaeser (Kaeser, 1989; Kaeser et al., 1989) bestand aus Dimethoxypropan (DMP, sauer; Merck, Darmstadt):Aceton (getrocknet) (1:2 v/v) mit 2 % Glutaraldehyd (in bidest. H<sub>2</sub>O gelöst), 0,59 % Uranylacetat (in Methanol gelöst) (Merck, Darmstadt) und 1,5 % Osmiumtetroxid. Nach Lin et al. (1977) reagiert DMP chemisch mit Wasser und produziert Aceton und Methanol. So kann der Probe ohne Trocknung Wasser entzogen werden. Die übrigen Komponenten fungieren nach der Substitution als zusätzliche chemische Fixanten. Glutaraldehyd lagert sich durch „cross-linking“ an freie Aminogruppen (Proteine) an, reagiert jedoch ungenügend mit Lipiden und Nucleinsäuren, Osmiumtetroxid immobilisiert und kontrastiert ungesättigte Lipide und andere Moleküle mit Doppelbindungen, reagiert aber unbedeutend mit Proteinen, Nucleinsäuren sowie gesättigten Lipiden und Uranylacetat fixiert und kontrastiert Nucleinsäuren (Nagl, 1981; Bullock, 1984). Ein Nachteil von DMP ist, daß es bereits bei -48°C gefriert, in Anwesenheit seiner Reaktionsprodukte Aceton und Methanol sinkt der Gefrierpunkt aber auf -85°C ab. Um eine Rekristallisierung von Wasser zu vermeiden, muß also ohne DMP bei mindestens -80°C substituiert werden (Steinbrecht und Müller, 1987). Bei der Verwendung mit DMP wurden die Präparate dem frisch angesetzten Substitutionsmedium bei -75°C zugegeben. Die Proben verblieben für 72 h im Substitutionsmedium. Mediumwechsel erfolgte nach 24 sowie 60 h. Mit einer stündlichen Temperaturzunahme von 5°C wurde danach eine Temperatur von -60°C erreicht, die für weitere 72 h gehalten wurde. Es folgte eine weitere Temperaturerhöhung von stündlich 5°C auf -30°C. Die Proben verblieben für 24 h bei dieser Temperatur. Nach Abschluss des Substitutionsprogramms wurden die Proben mehrfach bei -30°C gespült, 3 x 20 min mit DMP:Aceton (1:2, v/v) und 3 x 20 min mit reinem Aceton (getrocknet). Danach wurde die Temperatur innerhalb von 10 h bis auf Raumtemperatur erhöht. Parallel wurde eine zweite Substitutionsmethode in Anlehnung an Steinbrecht und Müller (Steinbrecht und Müller, 1987) verwendet. Die Proben verblieben dabei bei täglichem Mediumwechsel für 50 Stunden bei -90°C in getrocknetem Aceton mit 0,5 % Uranylacetat mit folgendem zweistündigem Temperaturanstieg auf -60°C. Danach wurde dem Medium mit 2 % Osmiumtetroxid angereichert. 10 Stunden später wurde die Temperatur innerhalb von 2 Stunden auf -30°C erhöht, die Proben wurden wieder in getrocknetes Aceton mit 0,5 % Uranylacetat gegeben und die Temperatur konnte langsam auf Raumtemperatur gesteigert werden.

Die mit dem Medium nach Kaeser substituierten Proben wurden daraufhin mit Araldit infiltriert und eingebettet. Aufgrund des so erreichten geringen Membrankontrast, wurde bei dem Substitutionsprotokoll ohne DMP eine Einbettung in Spurr's Medium vorgezogen.

Die mit einem Ultramikrotom (ULTRACUT E, Reichert, Österreich) angefertigten Ultradünnschnitte wurden mit gesättigter Uranylacetatlösung (2% in Methanol gelöst) und Bleicitrat (hergestellt aus Bleinitrat und Natriumcitrat; Merck, Darmstadt) kontrastiert und im Elektronenmikroskop EM 902 (Zeiss, Deutschland) untersucht.

Um die Dichte und Größe intramembranärer Membranpartikel auf den Thylakoidbruchflächen zu bestimmen, sollten Gefrierbruchuntersuchungen an *P. decipiens* durchgeführt werden. Nach erfolgreicher Cryofixierung und den durch-

geführten Gefrierbrüchen bei  $-150^{\circ}\text{C}$  (Bedampfung der Brüche mit Platin und Kohlenstoff) wurden die Replikas bei Raumtemperatur zunächst in Chlorbleichlauge gereinigt (Natrium-Hypochlorid; 5 min bei 30 %, 5 min bei 60 % und 24 h bei 100 %) (Merck, Darmstadt), daraufhin in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  gewässert und zuletzt in Chromschwefelsäure endgereinigt (5 min bei 3 %, 5 min bei 6 % und 24 h bei 10 %) (Merck, Darmstadt).

### 3.4 Malondialdehyd-Bestimmung

Die Bestimmung des Ausmaßes der Peroxidation von Lipiden erfolgte anhand der Konzentrationsbestimmung von Malondialdehyd (MDA), einem Produkt der Lipidperoxidation. Diese Methode basiert auf der Reaktion von MDA mit Thio-barbitursäure (TBA), wobei ein Molekül MDA mit zwei Molekülen TBA reagiert (Heath und Packer, 1968). Das Produkt ist eine pinkfarbene Lösung mit einem Absorptionsmaximum bei 532 nm. Thalli von *P. decipiens* und *Ph. austrogeorgica* wurden für 9 Stunden einer UV-Bestrahlung ausgesetzt ( $6 \text{ Wm}^{-2}$  UV-A,  $0,6 \text{ Wm}^{-2}$  UV-B). 200 mg Probenmaterial ( $n = 5$ ) wurden in flüssigem Stickstoff und Seesand fein gemörsert und in  $2 \times 500 \mu\text{l}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Nach der Zugabe von 1 ml 0,5 % TBA (gelöst in 20 % Trichloressigsäure) (Merck, Darmstadt) wurden die Proben für 30 min bei  $98^{\circ}\text{C}$  gekocht und sofort auf Eis gekühlt. Durch Zentrifugation bei 20000 g für 10 min erhält man einen klaren, pinkfarbenen Überstand, der bei der Wellenlänge von 532 nm (nach Subtraktion der Absorption bei 600 nm zur Korrektur von unspezifischer Trübung) mit einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer SPECTRAMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) gemessen wurde.

### 3.5 Fettsäurenbestimmung mittels Gaschromatographie

UV-Strahlung kann die Lipidzusammensetzung von pflanzlichen Zellen verändern, indem die Synthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die wichtig für die Membranfluidität ist, unterdrückt wird. Thalli von *P. decipiens* wurden für 84 Stunden durchgehend zusätzlicher UV-Bestrahlung ausgesetzt ( $6 \text{ Wm}^{-2}$  UV-A,  $0,6 \text{ Wm}^{-2}$  UV-B). Zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung nach Graeve et al. (2002) wurden ca. 500 mg Probenmaterial von *P. decipiens* unter Zugabe von Dichlormethan/Methanol (2:1; v:v) (Merck, Darmstadt) und  $50 \mu\text{l}$  19:0 Fettsäuren-Standard (10 mg/10  $\mu\text{l}$ ) mit einer Ultra-Thurrax (Ika-Werk, Deutschland) zerkleinert. Das Homogenisat wurde in einen Scheidetrichter gegeben, wobei die Reste noch zwei mal mit der Ultra-Thurrax nachextrahiert wurden. Nach der Zugabe von 5 ml 0,88 % KCl (Merck, Darmstadt) wurde die untere Phase in einen Rundkolben abgelassen. Die wässrige Phase wurde zwei mal mit 5 ml Dichlormethan/Methanol nachextrahiert. Nach Verdampfen des Lösungsmittels mit Stickstoff wurde der getrocknete Extrakt in 3 ml Dichlormethan/Methanol aufgenommen und in Röhrchen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  unter Stickstoff (sauerstofffreie Atmosphäre) aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde 1 ml dieses Extraktes unter Stickstoff verdampft und für 4 h bei  $80^{\circ}\text{C}$  mit 250  $\mu\text{l}$  Hexan (Merck, Darmstadt) und 1 ml 3 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (in Methanol gelöst) (Merck, Darmstadt) transesterifiziert. Nach Abkühlen erfolgte die Zugabe von ca. 4 ml bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  und ein dreimaliges Ausschütteln mit ca. 2-3 ml Hexan. Die obere Phase wurde jeweils in einem Spitzkolben vereinigt, unter Stickstoff eingedampft und in Hexan aufgenommen. 1  $\mu\text{l}$  des Extraktes wurde in den Gaschromatographen

Chrompack 9000 (Delft, Niederlande) mit einer 30 m x 0,25 mm-Kapilarsäule injiziert und gemessen.

### 3.6 PAM-Fluoreszenztechnik

Der Quotient  $F_v/F_m$ , die sogenannte maximale Quantenausbeute des PS II, ist ein Maß für den physiologischen Stresszustand einer Pflanze. Um den Zustand des Photosyntheseapparates zu prüfen, wurden an UV-bestrahlten und unbestrahlten Kontroll-Proben *in vivo*-Fluoreszenzmessungen mit dem Puls-Amplituden-Modulierten Chlorophyllfluorometer PAM-2000 (Walz, Efeltrich) durchgeführt. Das Gerät ermittelt die Fluoreszenzparameter  $F_0$ ,  $F_m$  und  $F_v$ .  $F_0$  spiegelt die Grundfluoreszenz wider und tritt auf, wenn sämtliche Reaktionszentren des PS II geöffnet sind, die Elektronentransportkette also vollständig oxidiert vorliegt. Zur Ermittlung von  $F_0$  wurde eine zuvor für 5 min dunkeladaptierte Probe mit einem Meßlicht geringer Intensität (ca.  $0.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bei 650 nm) bestrahlt, ohne dabei eine Ladungstrennung zu induzieren. Durch Gabe eines kurzen, starken Sättigungspulses ( $0.6 \text{ s}$ ,  $\sim 9200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wurden durch eine maximale Anregung die Primärakzeptoren vollständig reduziert. Die PS II-Zentren schließen vollständig, und die maximale Fluoreszenz  $F_m$  tritt auf. Die variable Fluoreszenz  $F_v$  ergibt sich aus der Differenz der beiden Grenzwerte  $F_m$  und  $F_0$ . Die Beziehung  $F_v/F_m$  der dunkeladaptierten Proben ergibt ein relatives Maß für die Effizienz der Photosynthese, d.h. mit welcher Quantenausbeute die Anregungsenergie aus den Antennenkomplexen in die geöffneten Reaktionszentren des PS II übertragen wird. Es wurden damit Veränderungen in der Photosynthese-Effizienz unter UV-Stress an *P. decipiens* und *Ph. austrogeorgica* gemessen.

### 3.7 Pigmentanalysen

Um Effekte von UV-Strahlung auf Photosynthese-Pigmente zu untersuchen, wurden die Konzentrationen von Chlorophyll *a* (chl *a*), Phycoerythrin (PE) und Phycocyanin (PC) ermittelt. Die verwendeten Methoden sind ausführlich in Publikation 1 beschrieben.

Um Zeit und Pflanzenmaterial zu sparen, wurde zudem eine Methode entwickelt, PE/PC und chl *a* nacheinander an einer Probe zu ermitteln. Nach der oben beschriebenen Methode der PE- und PC-Analyse wurden die Reste des Phosphatpufferüberstandes von den Pellets abgenommen. Nach Zugabe von 1 ml *N,N*-Dimethylformamid (DMF; Merck, Darmstadt) wurden die Pellets resuspendiert und über Nacht bei 4°C extrahiert. Nach der Zentrifugation der Proben für 20 min bei 15000 g wurde der Überstand mit dem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer SPECTRAmax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) gemessen und der chl *a*-Gehalt nach der in Publikation 1 angegebenen Formel ermittelt.

### 3.8 77K-Fluoreszenz-Spektroskopie

Um die verschiedenen pigmenthaltigen Proteinkomplexe des Photosyntheseapparates und den Energiefluss innerhalb des Photosystems zu untersuchen, wurden 77K-Anregungs- und Emissionsspektren der Tieftemperatur-Fluoreszenz mit dem Spektralfluorometer QuantaMaster QM1 (Photon Technology International, Kanada) gemessen. Man arbeitet bei 77 K, da aufgrund



der tiefen Temperatur geringere internukleare Bewegungen und somit schärfere Absorptions- und Fluoreszenzbanden entstehen. Zunächst wurden Thalli von *P. decipiens* in LN<sub>2</sub> mit Licht der Wellenlängen von 380 bis 680 nm angeregt und somit nach Auswertung der chl *a*-Fluoreszenz bei 690 nm Anregungsspektren (Excitationsspektren) ermittelt. Diese relative Effizienz verschiedener anregender Wellenlängen, die zu Fluoreszenz von PS II führen, entspricht qualitativ dem Absorptionsspektrum. Bei *P. decipiens* wurde somit ein Maximum bei 540 nm ermittelt. Die ermittelten Fluoreszenzpeaks wurden für die folgenden Emissionsspektren genutzt, bei denen eingefrorene Thalli mit Licht der Wellenlänge 540 nm angeregt und daraufhin die Fluoreszenzemission von 550 bis 800 nm aufgezeichnet wurde. Dabei erhält man Aufschlüsse über die Energieweiterleitung innerhalb des Photosystems. Aus diesen Daten kann man das Verhältnis zwischen PE (Emission bei 583 nm) und PS II Zentrum (Emission bei 693 nm) errechnen, um so eine Erhöhung der PE-Fluoreszenz bzw. Erniedrigung der PS II-Fluoreszenz nachzuweisen, was z. B. durch eine Entkopplung des PE vom Rest des Photosystems hervorgerufen würde.

Hierbei stellte sich jedoch heraus, daß bei der Verwendung von Thallusteilen im Gegensatz zu isolierten Chloroplastensuspensionen eine Quantifizierung der Fluoreszenz sehr problematisch war. Eine Standardisierung wurde darum vorgenommen, indem die Fluoreszenzkurven auf einen Messwert außerhalb des Fluoreszenzbereiches des Photosystems II (hier 750 nm) normiert wurden.

### 3.9 Northern blotting und Hybridisierung

Die Herstellung der cDNA-Sonden ist detailliert in Publikation 3 dargestellt. Um RNA für die Genexpressionsversuche verwenden zu können, ist es notwendig, eine ausreichende Menge möglichst reiner RNA zu isolieren. Die mit Standardprotokollen aus Rotalgen extrahierte RNA besitzt in der Regel hohe Konzentrationen an Polysacchariden und Proteinen, was bei der Auftrennung auf dem Agarose/Formaldehyd-Gel zu Schwierigkeiten führen kann. Nach erfolglosen Versuchen mit Säulchen-Kits, in denen die Bindung der RNA an Silicagel erfolgt, wurde eine Methode mit Lösungen gewählt. Aus dem Versuch entnommenes Probenmaterial (ca. 0,4 g FG) wurde in Stickstoff mit Seesand für 20 min gemörsert und mit peqGOLD RNAPure (peqlab, Erlangen) modifiziert extrahiert (für Details, siehe Publikation 3). Da so immer noch recht hohe Verunreinigungen durch Polysaccharide und Proteine auftraten, wurde die RNA anschließend mit peqGOLD OptiPure (peqlab, Erlangen) aufgereinigt. Die gewonnene RNA wurde mit einem 1,5 % Agarose/Formaldehyd-Gel getrennt und mittels Northern blotting auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Boehringer, Mannheim) aufgetragen. Die Membran wurde daraufhin für 2 h bei 40 °C prähybridisiert und über Nacht mit den Digoxigenin-markierten cDNA-Sonden hybridisiert. Nach Waschen der Membranen erfolgte die Detektion auf Autoradiographien (Hyperfilm MP, Amersham, Großbritannien). Die Mengen der *psbA*- und *rbcL*-Transkripte wurden direkt von den Autoradiographien bestimmt (GS-700 Imaging-Densitometer, Bio-Rad, München). Die Quantifizierung erfolgte über die Menge der auf das Gel aufgetragene Ethidiumbromid-gefärbte 28S-RNA (Fluor-S Multimager, Biorad, München).

### 3.10 MAA-Analyse mittels HPLC

10 – 20 mg Trockengewicht Probenmaterial (n = 5) wurden für 2 h bei 40 °C in 1 ml 25 % Methanol (Merck, Darmstadt) extrahiert. 400 µl der Lösung wurden unter Vacuum in der Speed Vac Plus SC110 A (Savant, Holbrook, USA) getrocknet. Der getrocknete Extrakt wurde in 400 µl 100 % Methanol aufgenommen und somit wieder in Lösung gebracht. 300 µl dieser Lösung wurden daraufhin unter Vacuum getrocknet und in 100 µl 2,5 % Methanol resuspendiert. 40 µl dieser Lösung wurden mit einer Waters HPLC (Waters 717plus Autosampler und 600 Controller) analysiert. Die MAAs wurden mit einer Knauer Spherisorb RP-8 Säule (5 µm, 250 x 4 mm i.d.) aufgetrennt. Die mobile Phase bestand aus 5 % Methanol (v/v in dest. H<sub>2</sub>O) und 0,1 % Essigsäure (v/v in dest. H<sub>2</sub>O) (Merck, Darmstadt). Die Identifizierung erfolgte durch die ermittelten Spektren, Laufzeit und durch Chromatographie mit Standards aus *Chondrus crispus* und *Porphyra umbilicalis*.

## 4 Zusammenfassung der Ergebnisse

### 4.1 UV-induzierte Änderungen der Feinstruktur

Um die bestmögliche, artefaktfreie elektronenmikroskopische Präparationsmethode zur Bestimmung der Ultrastruktur für *P. decipiens* und *Ph. austrogeorgica* zu ermitteln, wurden mehrere Thallus-Proben zum einen chemisch fixiert und zum anderen mittels der Hochdruckgefrieretechnik cryofixiert. Dabei hat sich gezeigt, daß die Proben nach Cryofixierung mit anschließender Gefriersubstitution und Einbettung in Spurr's Medium weniger Artefakte aufweisen als nach konventioneller chemischer Fixierung. Es war also eine Untersuchung nahe dem *in vivo*-Zustand möglich. Die Algen wurden mit einer in der Antarktis natürlich auftretenden Bestrahlungsstärke von  $6 \text{ W m}^{-2}$  UV-A und  $500 \text{ mW m}^{-2}$  UV-B für bis zu 16 Stunden im Labor bestrahlt. Um die Fähigkeit zur Erholung zu ermitteln, und somit zwischen regulativen Mechanismen und entstandenen Schäden unterscheiden zu können, wurde ein Teil der Proben nach der UV-Bestrahlung acht Stunden in Dunkelheit und anschließend 16 Stunden in schwachem Weißlicht belassen. Es zeigte sich, daß die Ultrastruktur der beiden untersuchten Arten unterschiedlich auf UV-Stress reagierte. Nach zwei Stunden UV-Bestrahlung erweiterten sich bei *P. decipiens* die Thylakoidinnenräume, nach vier Stunden bildeten sich vereinzelt Vesikel aus den normalerweise parallel verlaufenden Thylakoiden und nach acht Stunden bildeten sich „inside-out vesicles“ (Abb. 5-7, Publikation 1; Abb. 4-6, Publikation 2). Die Phycobilisomen waren dabei stets innen an die Membran der Vesikel angeheftet. Nach 12 bis 23 Stunden UV-Bestrahlung waren keine Vesikel mehr in den Chloroplasten von *P. decipiens* zu erkennen (Abb. 7, Publikation 2). Desweiteren zeigte sich eine veränderte Feinstruktur der Mitochondrien. Sie erschienen geschwollen und die Cristae bildeten sich nach acht Stunden UV-Bestrahlung vom Tubuli-Typ in den Sacculi-Typ um (Abb. 8, Publikation 1; Abb. 8, Publikation 2). Auch diese Veränderungen waren nach 23 Stunden reversibel. Im Gegensatz zu *P. decipiens* reagierte *Ph. austrogeorgica* mit einer Zerstörung der Chloroplastenhülle und Thylakoidmembranen auf den UV-Stress. Hierbei lösten sich nach zwölf Stunden UV-Bestrahlung die Phycobilisomen von den Membranen und verteilten sich in der Zelle (Abb. 16, Publikation 2). Zudem zeigt diese Art im ungestressten Zustand verschiedene Typen von Proteinkristallen im Cytoplasma. Unter UV-Einwirkung veränderte sich deren Struktur, indem sich entweder die Lamellen-Substruktur auflockerte und brach (Abb. 20-23, Publikation 2) oder sich stark elektronendichte Kristalle in mehrere kleine, mit geringer elektronendichten Randbereichen, auflösten (Abb. 24 & 25, Publikation 2).

Um die Dichte und Größe intramembranärer Membranpartikel, also u. a. die Photosystemkomplexe auf den Thylakoidbruchflächen zu bestimmen, sollten Gefrierbruchuntersuchungen an *P. decipiens* durchgeführt werden. Nach erfolgreicher Cryofixierung und den durchgeführten Gefrierbrüchen stellte sich aber heraus, daß die Reinigung der Replikas zu schwierig war. Leider konnten somit keine verwertbaren Aufsichten auf Membranbruchflächen oder -oberflächen hergestellt werden.

#### 4.2 UV-induzierte Veränderungen in der Malondialdehyd-Konzentration

Eine Schädigung von Membransystemen, die eine Verringerung der optimalen Quantenausbeute und Veränderung der Respirationsrate bewirken könnte, konnte mit der UV-induzierten Peroxidation von Membranlipiden korreliert werden. Hier zeigte sich schon bei einer UV-Bestrahlung von drei Stunden, daß *Ph. austrogeorgica* eine höhere Konzentration von MDA aufwies als *P. decipiens* (Abb. 2). Auch während des restlichen Versuchsablaufs blieben die MDA-Konzentrationen in *Ph. austrogeorgica* stets höher als in *P. decipiens*, was auf stärkere Membranschädigung hinweist.

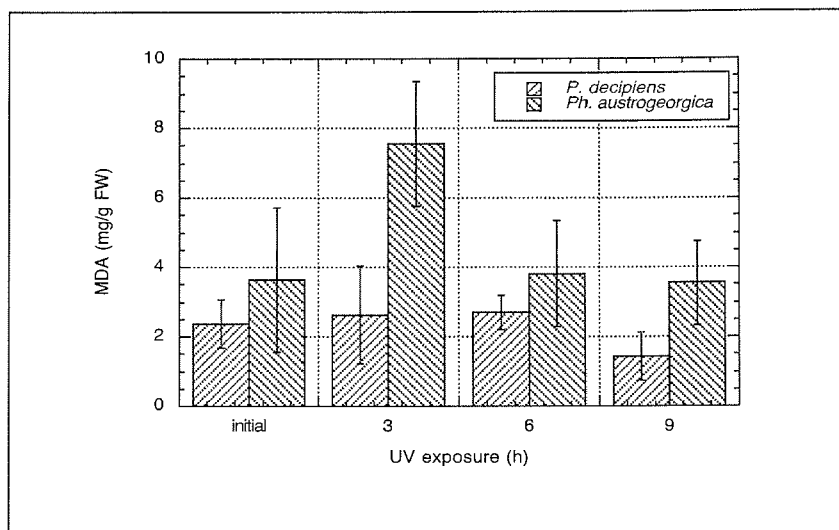


Abb. 2: MDA-Konzentrationen von *P. decipiens* und *Ph. austrogeorgica* in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (0-9 h).

#### 4.3 UV-induzierte Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung

Um eine eventuelle Veränderung im Verhältnis von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren von *P. decipiens* und damit eine Beeinträchtigung der Membranfluidität nachzuweisen, wurde mittels Gaschromatographie auch die Zusammensetzung der gesamten Fettsäuren untersucht (Abb.3). Es zeigte sich, daß diese polare Algenart besonders reich an der mehrfach-ungesättigten Fettsäure 20:5 (n-3) ist (Abb. 4). Allerdings konnte auch nach 84 Stunden UV-Dauerbestrahlung keine Veränderung in der Fettsäurezusammensetzung nachgewiesen werden (Abb. 5).

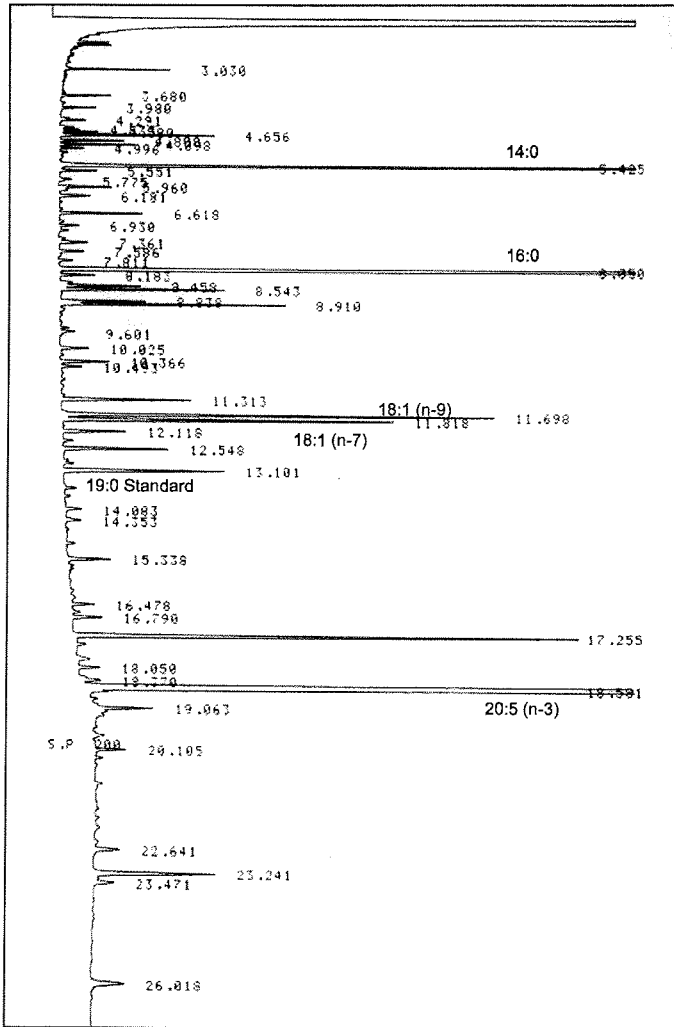


Abb. 3: Gaschromatogramm der Weißlichtkontrolle von *P. decipiens* mit den Laufzeiten der ermittelten Fettsäuren (min) und deren Kennzeichnung.

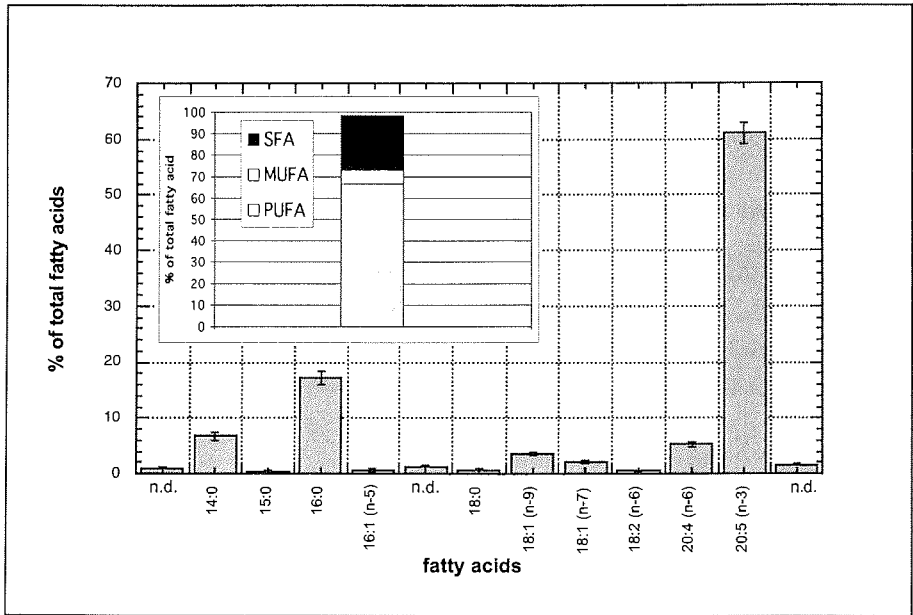


Abb. 4: Fettsäurezusammensetzung in der Weißlichtkontrolle von *P. decipiens* (SFA = gesättigte Fettsäuren, MUFA = einfach ungesättigte Fettsäuren, PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren, n.d. = nicht bestimmt).

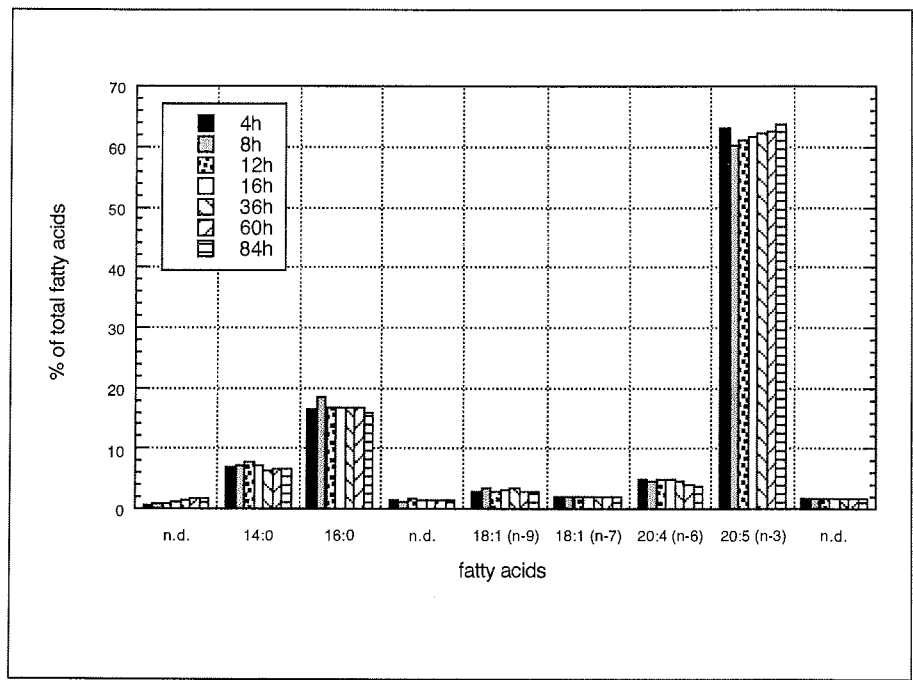


Abb. 5: Fettsäurezusammensetzung in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (0-84 h) in *P. decipiens* (n.d. = nicht bestimmt).

#### 4.4 UV-induzierte Veränderungen in der Maximalen Quantenausbeute

An *P. decipiens* und *Ph. austrogeorgica* wurden die kurzzeitigen Veränderungen der Photosynthese-Effizienz unter UV-Stress untersucht. Es zeigte sich, daß *Ph. austrogeorgica* aus dem unteren Sublitoral schon nach einer Stunde UV-Bestrahlung empfindlicher auf den UV-Stress reagierte als *P. decipiens* aus dem oberen Sublitoral (Abb. 6).

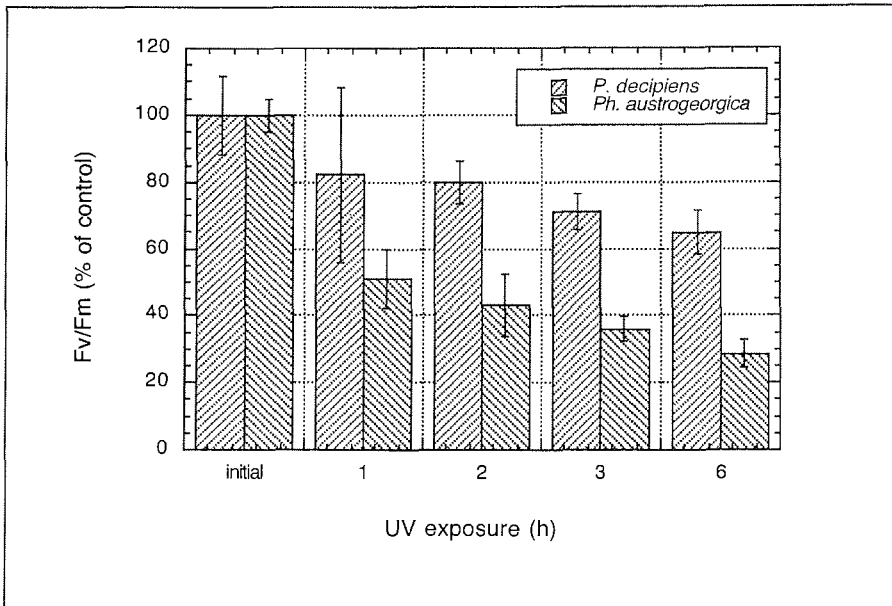


Abb. 6: Maximale Quantenausbeute in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (0-6 h) bei *P. decipiens* und *Ph. austrogeorgica*.

Im weiteren Verlauf deutet sich bei *P. decipiens* eine Fähigkeit zur vollständigen Erholung der Photoinhibition innerhalb von 21 Stunden Erholungszeit (8 Stunden Dunkelheit und 13 Stunden Schwachlicht) an, wobei der Grad der Photoinhibition bei *Ph. austrogeorgica* im gleichen Zeitraum unverändert blieb, die Alge sich also nicht mehr erholte (Abb. 7).

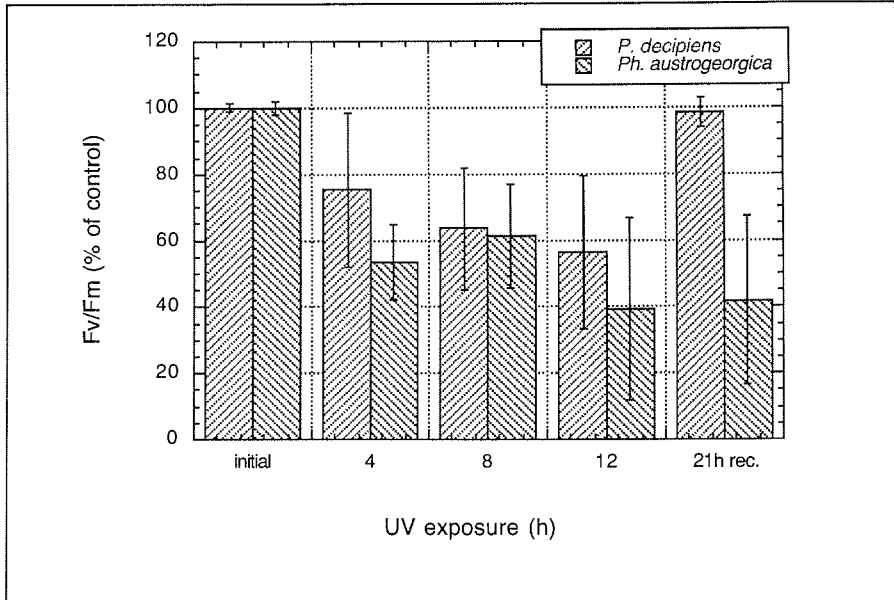


Abb. 7: Maximale Quantenausbeute in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (0-12 h und 21 h Erholung) bei *P. decipiens* und *Ph. austrogeorgica*.

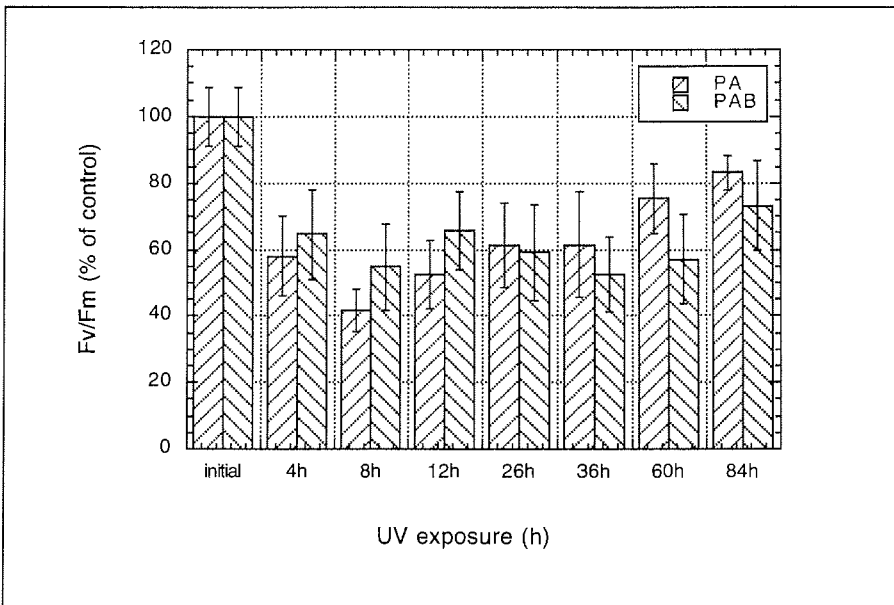


Abb. 8: Maximale Quantenausbeute in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (0-84 h) bei *P. decipiens* (PA = PAR + UV-A, PAB = PAR + UV-A+B).



Wenn Thalli von *P. decipiens* mit Weißlicht plus UV-A (PA) oder Weißlicht plus UV-A+B (PAB) bestrahlt wurden, war in den ersten zwölf Stunden der Bestrahlung der UV-A-Anteil in geringerem Maß für die Photoinhibition verantwortlich, wobei sich der Unterschied nach 16 Stunden UV-Bestrahlung sowie nach folgender 8stündiger Dunkelperiode mit anschließender 10stündiger normaler Weißlichtphase (ohne UV) aufhob (Publikation 1, Abb. 9). Nach der Erholungsphase wurden bei beiden Ansätzen 80 % der jeweiligen Initialwerte erreicht. In einem vergleichbaren, jedoch längeren Versuch mit 84 Stunden Dauerbestrahlung zeigte sich, daß *P. decipiens* die Fähigkeit besitzt, sich auch unter UV-Stress zu erholen. Nach acht Stunden Bestrahlung mit Weißlicht plus UV-A (PA) sank die Photosynthese-Effizienz zunächst auf 40 % der Weißlichtkontrolle ab, nach 84 Stunden wurde jedoch wieder ein Wert von 80 % der Kontrolle erreicht (Abb. 8).

Ähnlich verhielt es sich mit zusätzlicher UV-B-Bestrahlung (PAB). *P. decipiens* ist sogar in der Lage, sich an eine noch längere UV-Exposition anzupassen. Während nach einem Tag UV-A+B-Bestrahlungszyklus eine Photosynthese-Effizienz von 50 % der Weißlichtkontrolle gemessen wurde, stellt sich nach 15 Tagen ein Wert von 87 % ein (Abb. 9).

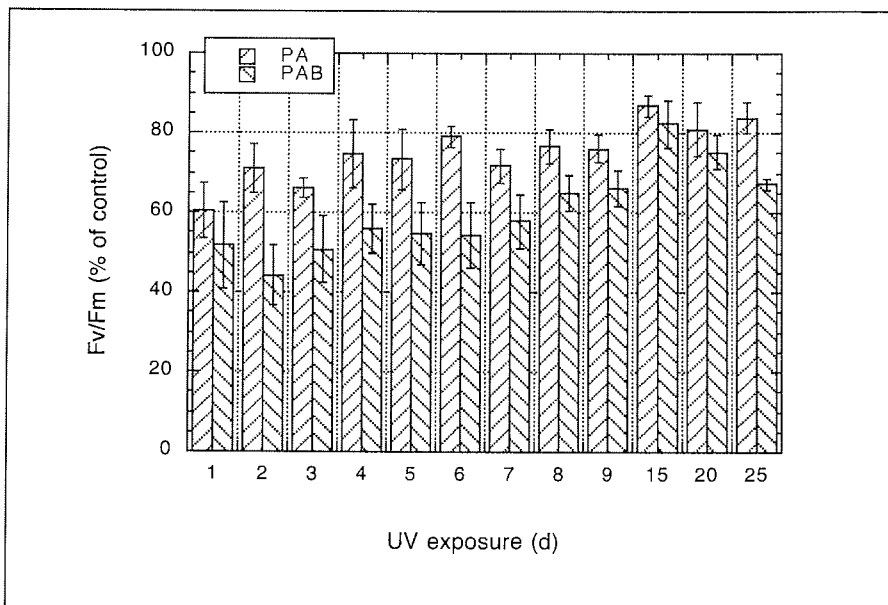


Abb. 9: Maximale Quantenausbeute in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (1-25 d) bei *P. decipiens* (PA = PAR + UV-A, PAB = PAR + UV-A+B).

#### 4.5 UV-induzierte Veränderungen der Pigmentkonzentrationen

UV-Strahlung kann die Konzentration von Chlorophyll *a* (chl *a*) und anderen photosynthetischen Pigmenten, wie Phycoerythrin und Phycocyanin verringern. Während *P. decipiens* nach sechs Stunden UV-Bestrahlung mit einer geringen Abnahme der chl *a*-Konzentration reagierte, zeigte *Ph. austrogeorgica* im gleichen Zeitraum dagegen eine deutliche Zunahme des Pigments (Abb. 10).

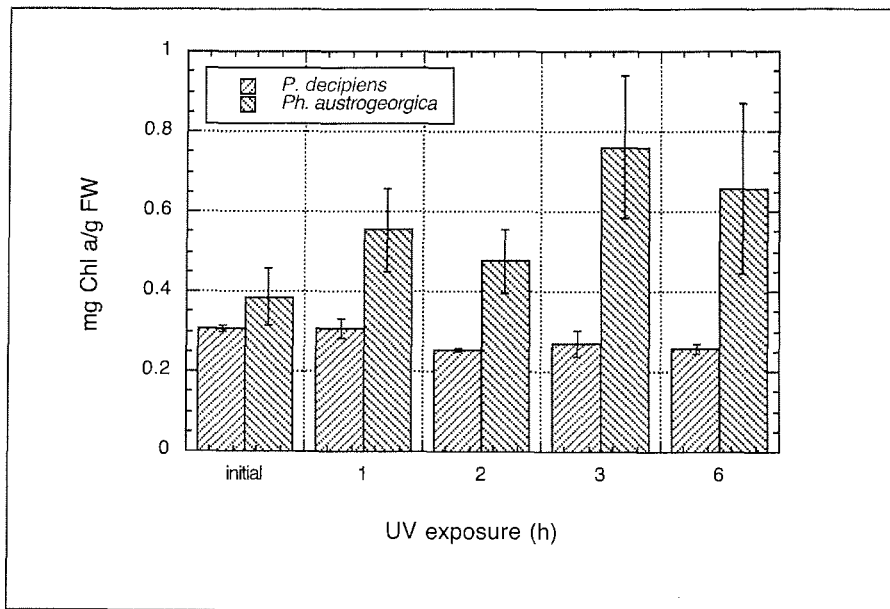


Abb. 10: Chlorophyll *a*-Konzentrationen in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (0-6 h) bei *P. decipiens* und *Ph. austrogeorgica*.

Ähnlich verhielt es sich bei den akzessorischen Antennenpigmenten Phycoerythrin (PE) und Phycocyanin (PC). *P. decipiens* zeigte nach sechs Stunden UV-Bestrahlung keine Veränderung im Phycoerythrin- und Phycocyaningehalt, während *Ph. austrogeorgica* mit einer Zunahme dieser Pigmente reagierte (Abb. 11 und 12).

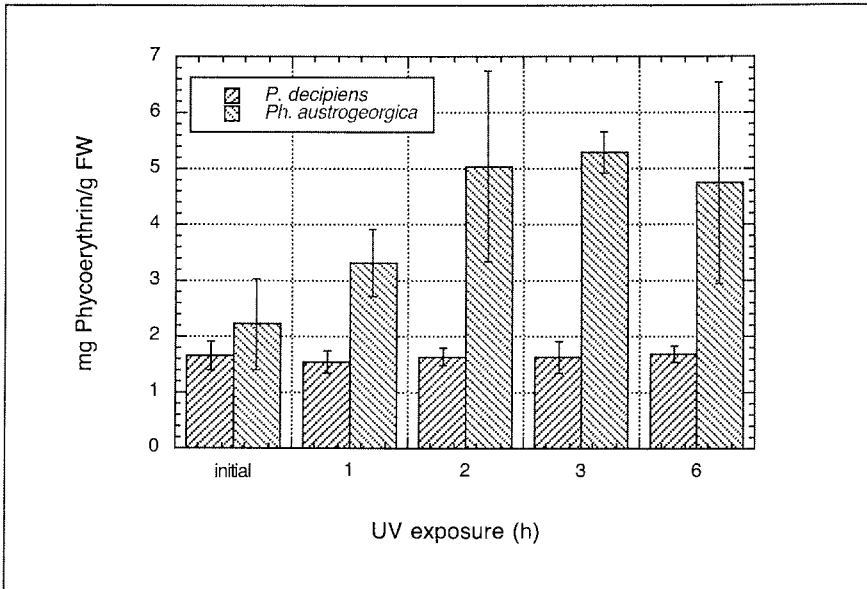


Abb. 11: Phycoerythrin-Konzentrationen in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (0-6 h) bei *P. decipiens* und *Ph. austrogeorgica*.

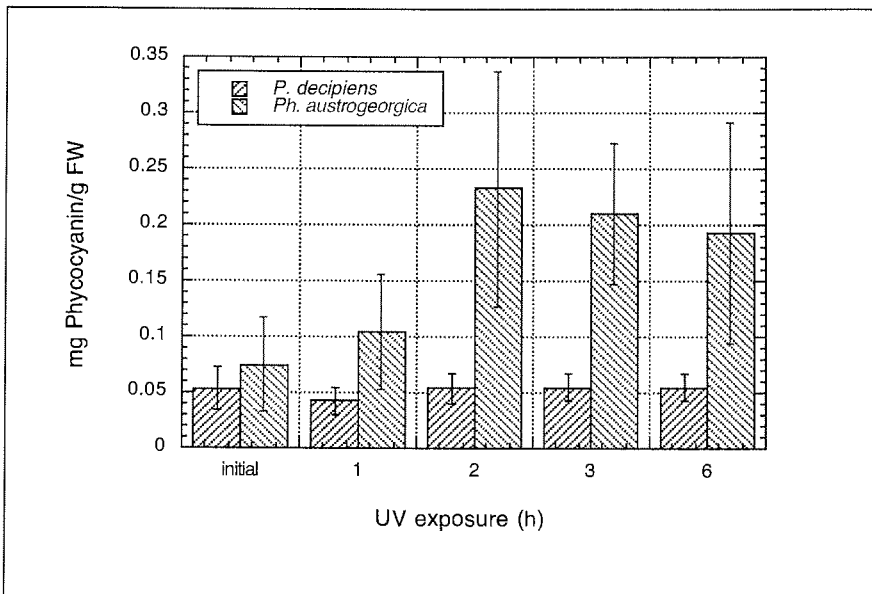


Abb. 12: Phycocyanin-Konzentrationen in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (0-6 h) bei *P. decipiens* und *Ph. austrogeorgica*.

Im folgenden wurden die Pigmentuntersuchungen auf *P. decipiens* konzentriert. In einem Versuch über den gesamten Tagesverlauf wurde gezeigt, daß chl *a* in den ersten vier Stunden UV-Exposition geringere Konzentrationen aufwies als die Weißlichtkontrolle, nach sechs Stunden war der Effekt jedoch wieder ausgeglichen (Abb. 13).

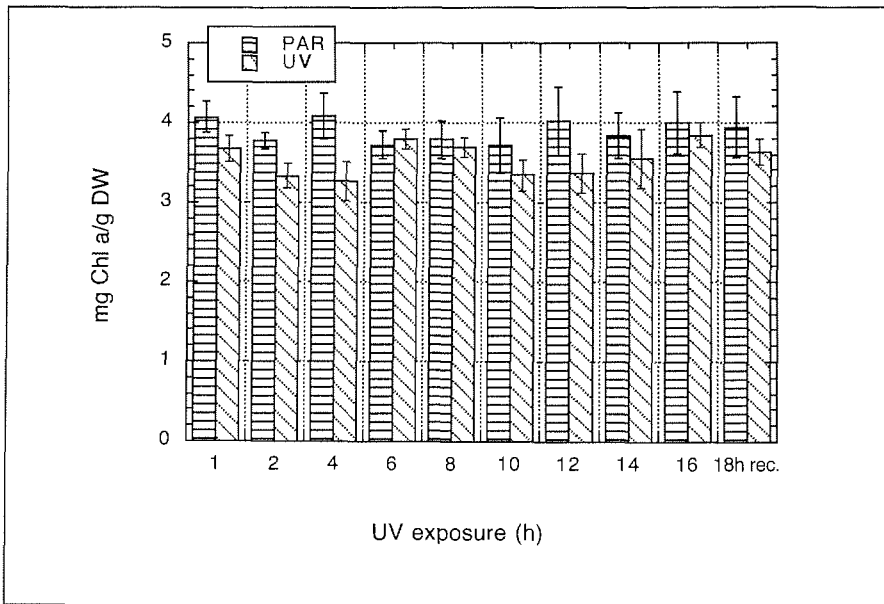


Abb. 13: Chlorophyll *a*-Konzentration in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (1-16 h und 18 h Erholung) bei *P. decipiens*.

Sogar im Langzeitversuch über 11 Tage und einer höheren UV-Bestrahlungsstärke ( $11 \text{ W m}^{-2}$  UV-A und  $1 \text{ W m}^{-2}$  UV-B) konnten keine UV-induzierten Veränderungen der chl *a*-Konzentrationen nachgewiesen werden (Abb. 14).

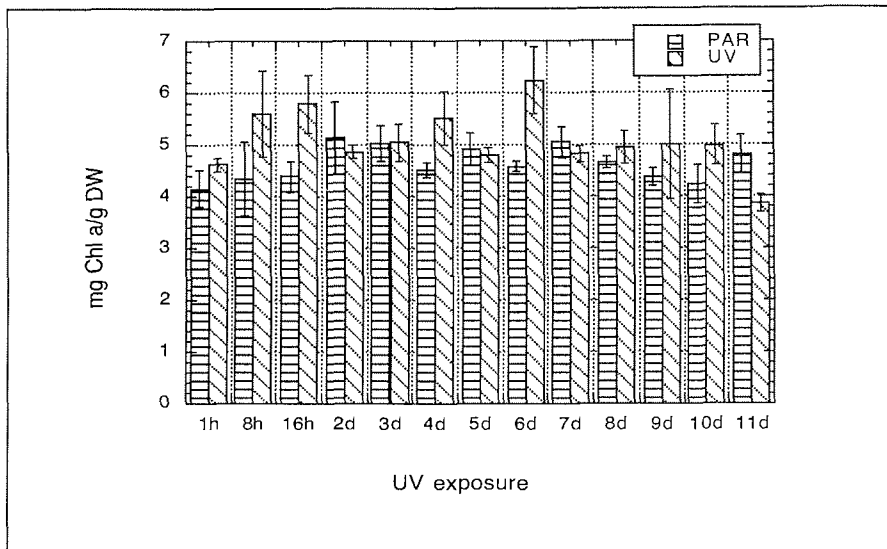


Abb. 14: Chlorophyll *a*-Konzentration in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (1 h -11 d) bei *P. decipiens*.

Weiterhin wurde untersucht, wie sich die chl *a*-Konzentrationen unter den getrennten UV-Wellenlängenbereichen im Tagesgang von 16 Stunden Exposition verhalten. Hier zeigte sich, daß zwar nach den ersten vier Stunden UV-A+B-Bestrahlung ein Trend zur Konzentrationserhöhung von chl *a* besteht, innerhalb des gesamten Versuchszeitraums jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den getrennten UV-Bereichen nachzuweisen sind (Publikation 1, Abb. 10). Bei den Phycobilinen hingegen wurde eine anfängliche UV-B-induzierte Abnahme in der PE- und PC-Konzentration beobachtet, während unter Ausschluss von UV-B keine Veränderungen im Vergleich zur Weißlichtkontrolle gemessen wurden (Publikation 1, Abb. 11 und 12). Die anfängliche PE- und PC-Abnahme regulierte sich nach 12 Stunden UV-Exposition jedoch wieder auf Kontrollniveau.

#### 4.6 UV-induzierte Veränderungen im Energiefluss innerhalb des Photosystems

Um die verschiedenen pigmenthaltigen Proteinkomplexe des Photosyntheseapparates und den Energiefluss innerhalb des Photosystems zu untersuchen, wurden 77K-Emissions- und Anregungsspektren der Tieftemperatur-Fluoreszenz bestimmt.

Regt man die Pigmente von *P. decipiens* mit Licht der Wellenlängen 400 – 660 nm an und mißt daraufhin die maximale Emission der Chlorophyll-Fluoreszenz bei 690 nm, erhält man ein Anregungsspektrum (Abb. 15). Das Anregungsmaximum liegt bei 540 nm, was der Anregung von Phycoerythrin entspricht.

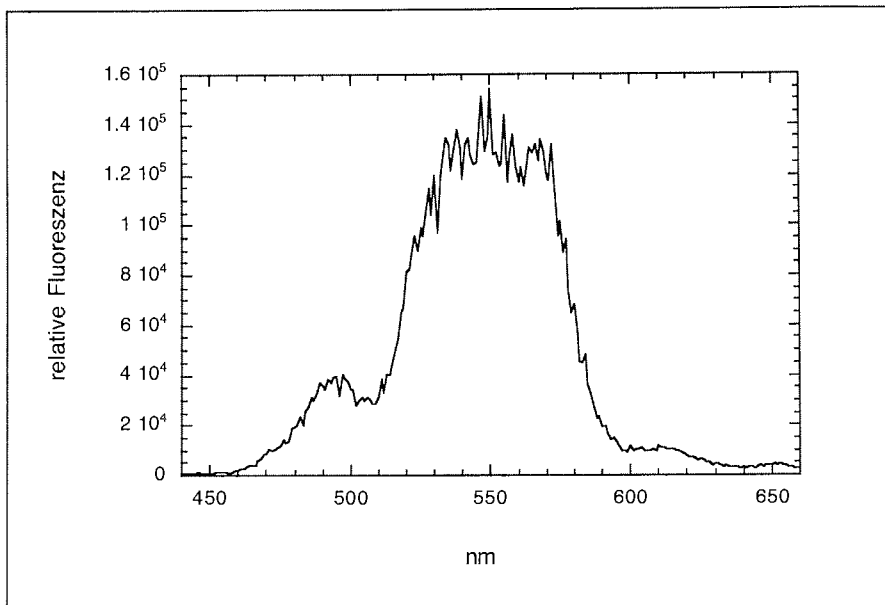


Abb. 15: Anregungsspektrum von *P. decipiens* (Anregung 380-680 nm, Fluoreszenz gemessen bei 690 nm).

Nach Anregung der Thalli mit der Wellenlänge 540 nm (Anregung von PE) nach zunehmender UV-Exposition erhält man Fluoreszenzemissionsspektren (Abb. 16). Hier zeigte sich, daß bei zunehmendem UV-Stress die Fluoreszenz des akzessorischen Phycoerythrins (PE, Emission bei 583 nm) zunimmt, während die des PS II (Emission bei 693 nm) abnimmt. Zudem erhöhte sich die Fluoreszenz-Emission von PS I bei 728 nm, was darauf hindeutet, daß die Energieverarbeitung in PS I gestört war.

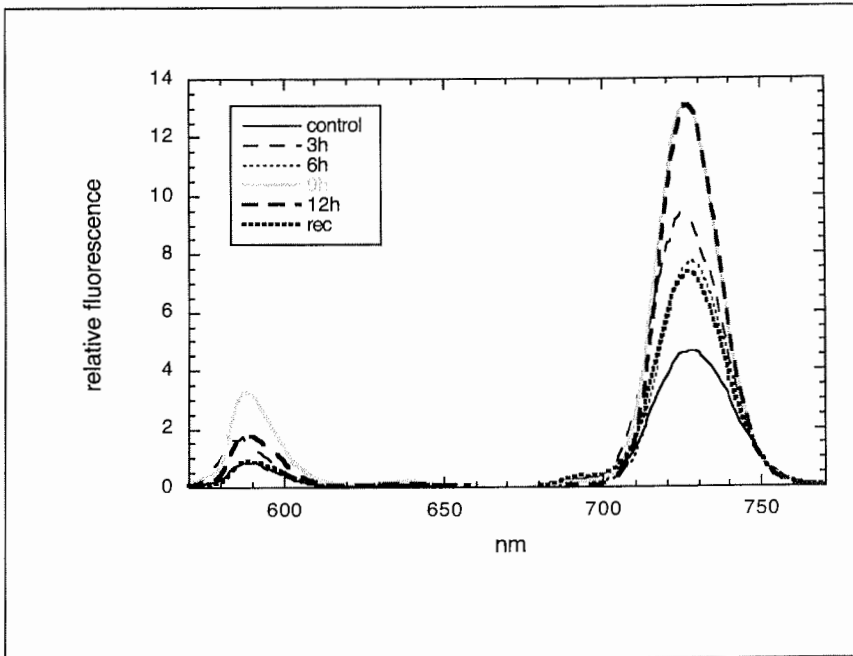


Abb. 16: 77K-Fluoreszenz-Emissionsspektren (Anregung 540 nm) von *P. decipiens* in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (0-12 h und 14 h Erholung).

Trägt man das Verhältnis PE (Emission bei 583 nm)/PS II Zentrum (Emission bei 693 nm) auf, so erhält man bei zunehmender UV-Exposition eine Erhöhung um den Faktor 14 (Abb. 17). Nach einer Erholungsphase von 14 Stunden (Dunkelheit und Weißlicht) ist das Verhältnis wieder auf dem Niveau des Initialwerts, die Alge hat sich somit vollständig vom UV-Stress erholt und die Energieverteilung entspricht dem vor dem UV-Stress.

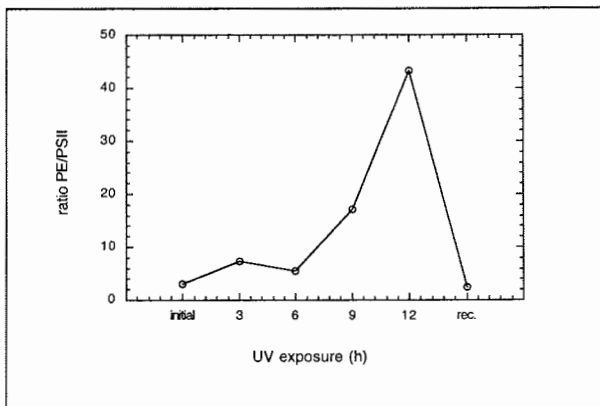


Abb. 17: Verhältnis in der Fluoreszenzemission von Phycoerythrin (Emission bei 583 nm) zu Photosystem II (Emission bei 693 nm) bei *P. decipiens* in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (0-12 h und 14 h Erholung).

#### 4.7 UV-induzierte Veränderungen in der Genexpression

Es stellte sich nun die Frage, in wie weit Regulationsprozesse in der Proteinsynthese der Photosysteme durch UV-Bestrahlung betroffen sind. Deshalb wurde auch die Genexpression von Photosynthese-Proteinen in Abhängigkeit von UV-Bestrahlung bei *P. decipiens* untersucht. Die Transkript-Level von *psbA* (D1-Protein) nahmen im Vergleich zur Weißlichtkontrolle am Anfang und am Ende eines Bestrahlungszyklus zu, während *rbcL*-Transkripte (Rubisco LSU) lediglich in den ersten beiden Stunden höher waren als die der Weißlichtkontrolle und im weiteren Tagesverlauf die Transkription sogar unterdrückt wurde (Abb. 3, Publikation 3). Im Langzeitversuch über 11 Tage bei einer höheren UV-Bestrahlung ( $11 \text{ W m}^{-2}$  UV-A und  $1 \text{ W m}^{-2}$  UV-B) zeigten die *psbA*-Transkriptwerte nach einer Stunde eine erniedrigte Transkriptionsrate mit einem anschließenden Anstieg auf über 400 % im Vergleich zur Weißlichtkontrolle (Abb. 5, Publikation 3). Der *rbcL*-Transkriptwert erreichte nach anfänglicher Unterdrückung erst nach 4 Tagen UV-Bestrahlung die Kontrollwerte, danach stieg der Wert auf 180 % der Kontrolle an. Das D1-Protein wurde demgemäß während UV-Stress stärker neu synthetisiert als Rubisco, was den Literaturwerten über die Proteine entspricht. Das D1-Protein im Reaktionszentrum von PS II unterliegt somit einer stärkeren Turn-over-Rate.

#### 4.8 UV-induzierte Veränderungen in den MAA-Konzentrationen

Die bisher dargestellten Effekte von UV-Strahlung auf *P. decipiens* lassen den Schluss zu, daß diese Art mit wirkungsvollen Akklimatisations- und Schutzmechanismen gegen Starklicht und UV-Stress ausgestattet sein muß. Neben produktiven antioxidativen Strategien könnte auch die Produktion von UV-absorbierenden Mycosporin-ähnlichen Aminosäuren (MAAs) eine Rolle spielen. Im Tagesgang stieg die MAA-Produktion, vor allem von P-334, schon nach acht Stunden UV-Exposition an (Abb. 18).



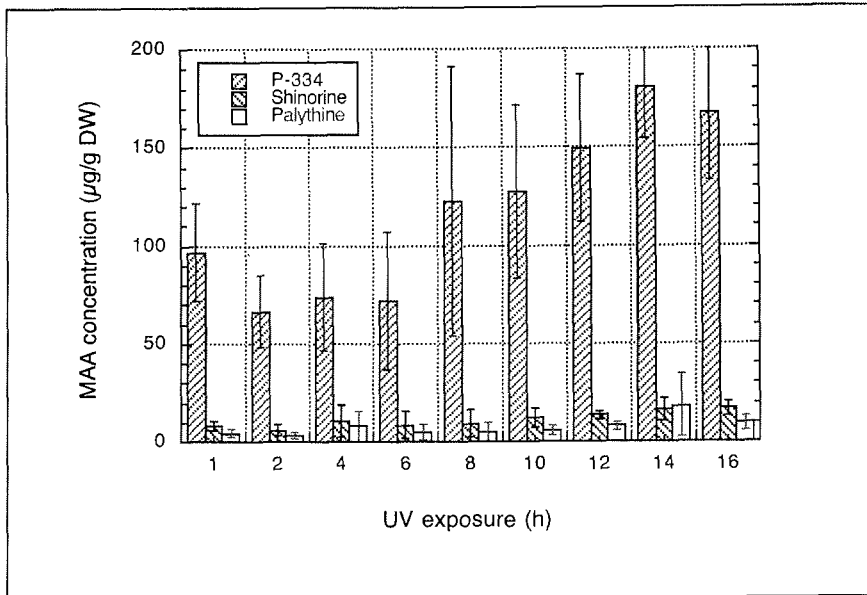


Abb. 18: MAA-Konzentrationen in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (1-16 h) bei *P. decipiens*.

Während die Gesamtkonzentration innerhalb von 84 Stunden Weißlicht-Dauerbestrahlung unverändert blieb, verdreifachte sich die ermittelte Menge bei zusätzlicher UV-A-Bestrahlung (Abb. 19). Nach elf Tagen UV-Bestrahlung mit  $11 \text{ W m}^{-2}$  UV-A und  $1 \text{ W m}^{-2}$  UV-B stieg die Produktion von P-334 sogar um den Faktor 14 (Abb. 20).

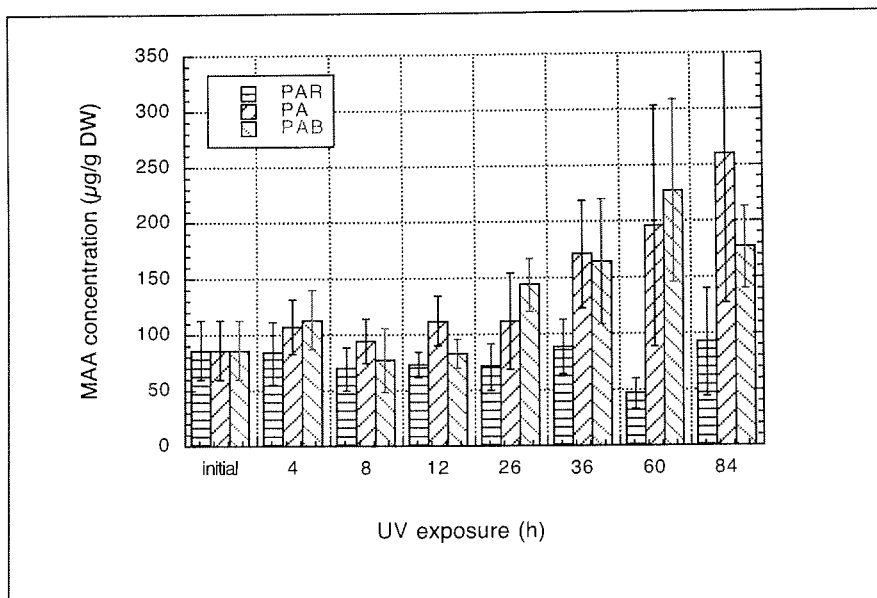


Abb. 19: MAA-Gesamtkonzentration in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (0-84 h) bei *P. decipiens* (PAR = Weißlicht, PA = PAR + UV-A, PAB = PAR + UV-A+B).

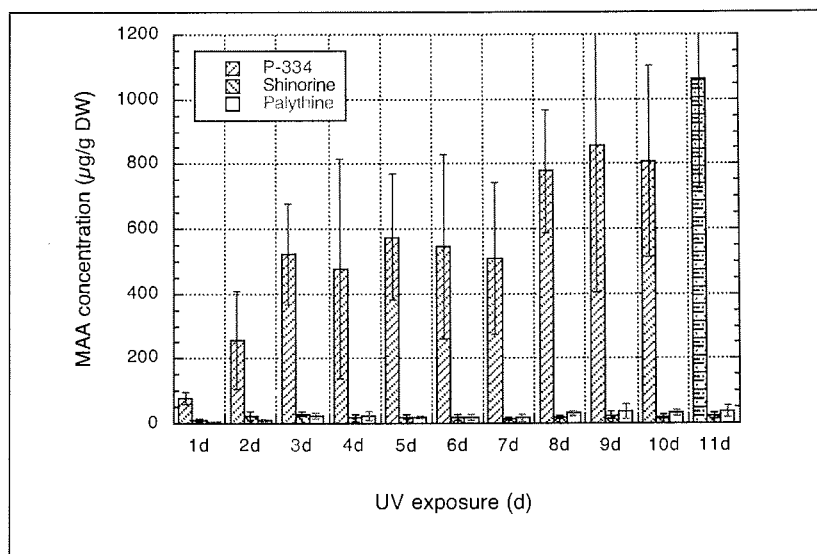


Abb. 20: MAA-Konzentrationen in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (1-11 d) bei *P. decipiens*.

Abb. 21 zeigt die MAA-Produktion auch in Abhängigkeiten der verschiedenen UV-Bereiche. In den ersten Tagen stiegen die MAA-Werte besonders im gesamten UV-Bereich (PAB), während die Produktion unter Weißlicht plus UV-A (PA) erst später anstieg.

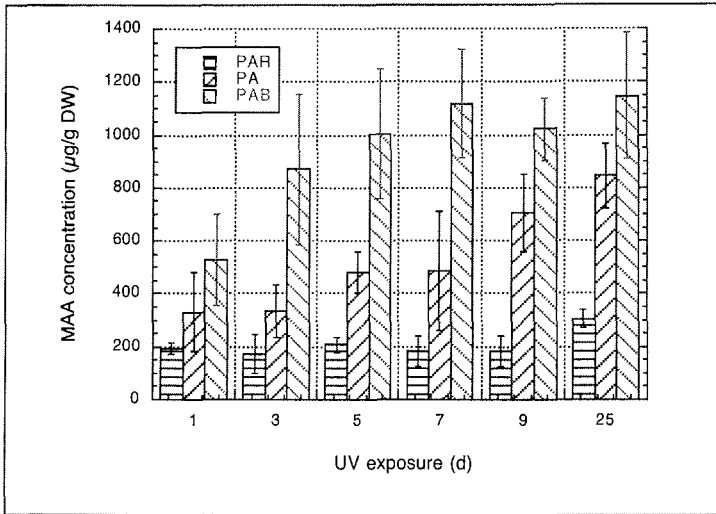


Abb. 21: MAA-Konzentration in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlung (1-25 d) bei *P. decipiens* (PAR = Weißlicht, PA = PAR + UV-A, PAB = PAR + UV-A+B).

## 5 Diskussion

### 5.1 Bestrahlungsbedingungen

In den Versuchen wurden UV-B-Bestrahlungsstärken von  $0,58 - 0,97 \text{ W m}^{-2}$  (280 – 320 nm) ausgewählt. Die niedrigen Werte kommen an normalen Sommertagen in der Antarktis vor, während ca.  $1 \text{ W m}^{-2}$  Extrembedingungen an einem Sommertag mit hohem Sonnenstand zur Zeit höchster Ozonverringering darstellen, die jedoch nur während eines kurzen Zeitraums vorkommen (H. Tüg, pers. Mitteilung). Zur Zeit der größten Ausdehnung des Ozonlochs wurden auf King George Island, einem natürlichen Standort der beiden verwendeten Arten, sogar  $1,8 \text{ W m}^{-2}$  als kurzfristiger Maximalwert gemessen (Hoyer et al., 2001). Im Vergleich dazu zeigen die Maximalwerte der UV-B-Messungen auf Spitsbergen  $1,1 \text{ W m}^{-2}$ , auf Helgoland  $2 \text{ W m}^{-2}$  und in Cadiz (Südspanien)  $3,6 \text{ W m}^{-2}$  (Bischof et al., 1998; Häder et al., 2001; K. Bischof, pers. Mitteilung). Die Untersuchungen sollten somit natürlich zu erwartende Effekte bei diesen Arten aufzeigen. Ein kritischer Punkt bei Laborversuchen ist die Simulation der UV-Strahlungsbedingungen. Die in den Versuchen verwendeten Bestrahlungsquellen können nur annähernd das natürliche Spektrum wiedergeben. Die Bestrahlungsbedingungen mit den verwendeten Fluoreszenzröhren des Typs Q-Panel UVA-340 ergeben ein UV-B:UV-A-Verhältnis von ca. 1:10. In der Arktis wurde ein Verhältnis von 1:20 gemessen (Bischof et al., 1998). In der Natur sind hohe UV-Strahlungswerte immer begleitet von hohen PAR-Werten. In diesen Versuchen wurden jedoch relativ geringe PAR-Bestrahlungsstärken ausgewählt, um Starklichteffekte durch PAR auszuschließen. Die in antarktischen Gewässern vorkommenden Algenarten sind in der Regel schwachlichtadaptiert (Kirst und Wiencke, 1995), somit sollte die benutzte Weißlichtbestrahlungsstärke keinen limitierenden Faktor darstellen.

### 5.2 Elektronenmikroskopie

Meine Arbeiten stellen die ersten Untersuchungen zu den Auswirkungen von UV-Strahlung auf die Ultrastruktur von Makroalgen dar. Um die Ultrastruktur von Rotalgen zu untersuchen, mußte zunächst eine möglichst artefaktfreie Fixierungsmethode gefunden werden. Zur chemischen Fixierung mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxyd sind verschiedene Artefakte beschrieben worden, wie Membranvesikulierungen, Negativkontrast von Membranabbildungen, Extraktion von Proteinen und Lipiden sowie Schrumpfen (Glutaraldehyd) oder Schwellen (Osmiumtetroxyd) von Zellen und Organellen (Hayat, 1981). Wichtige Faktoren für die Qualität der chemischen Fixierung sind somit die Beschaffenheit des zu fixierenden Gewebes, Temperatur, Dauer und Osmolarität. Versuche, Thalli von *P. decipiens* chemisch zu fixieren, zeigten, daß die Zellwände der Rotalgen eine Barriere für Fixantien darstellt. Es wurden Membranveränderungen, geschrumpfte Zellen und Organellen sowie aufgeblähte Zellwände beobachtet. Weiterhin werden bei der chemischen Fixierung mit in Puffer gelöstem Glutaraldehyd die wasserlöslichen Phycobilisomen von der Thylakoidmembran getrennt und aufgelöst (siehe Publikation 1 und 2). Somit stellt die Cryofixierung mit anschließender Gefriersubstitution eine besser geeignete Methode dar, Rotalgen zu fixieren. Die Vorteile liegen in der weitaus kürzeren Fixierungszeit (ca. 20

ms), geringerer Artefaktbildung und in einer guten Abbildung der Phycobilisomen (siehe Publikation 1 und 2).

Bei der Gefriersubstitution wird bei tiefen Temperaturen das Wasser durch ein Lösungsmittel ersetzt. Wichtig ist hierbei, daß dieser Prozess vollständig abgeschlossen ist bevor die Temperatur erreicht wird, bei der Eiskristalle im Gewebe entstehen können. Neben der Beschaffenheit der Proben ist weiterhin entscheidend, bei welcher Temperatur die chemischen Fixantien reagieren. Glutaraldehyd fixiert Proteine schon ab  $-50^{\circ}\text{C}$ , wobei sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei höheren Temperaturen erhöht (Humbel et al., 1983). Nach White et al. (White et al., 1976) kann  $\text{OsO}_4$  zwar schon bei einer Temperatur von  $-70^{\circ}\text{C}$  mit Doppelbindungen von ungesättigten Fettsäuren reagieren, in Aceton gelöst ist es jedoch bei Raumtemperatur nicht mehr stabil. Es besteht also die Möglichkeit, daß Proteine und Lipide noch vor der abgeschlossenen Fixierung ausgewaschen werden. Hier spielen zudem die Temperatur und das Entwässerungsmedium eine Rolle. Bei niedrigen Temperaturen verringert sich die Extraktion, und Aceton soll im Vergleich zu Ethanol eine stärkere Extraktion hervorrufen (Plattner, 1983).

Es zeigte sich jedoch auch bei dieser Methode, daß Artefakte bei der Fixierung von Rotalgen auftreten können. Neben einer verringerten Harzinfiltration wurden nach Literaturangaben vor allem schwach kontrastierte Membranen beobachtet (Babuka und Pueschel, 1998; Bourett et al., 1999; Dubochet und Sartori Blanc, 2001). Ein Vergleich zwischen Spurr und Araldit zeigte jedoch, daß in Spurr eingebettete Proben einen etwas besseren Membrankontrast ergaben und dieses Harz im Elektronenstrahl stabiler ist. Voraussetzung für die Membrankontrastierung ist die Behandlung der Proben mit  $\text{OsO}_4$ . Es lagert sich an die Doppelbindungen ungesättigter Lipide an und wirkt kontraststeigernd. Dieser Effekt wird durch Anlagerung von Blei- (Bleicitrat) und Uranyl-Ionen (Uranylacetat) an  $\text{OsO}_4$  weiter verstärkt. Entscheidend ist also die Einwirkung von  $\text{OsO}_4$  auf die Lipide. Bei der Methode von Kaeser (Kaeser, 1989; Kaeser et al., 1989) wurde es dem Substitutionsmedium von vornherein zugegeben, konnte also schon bei der Anfangstemperatur von  $-75^{\circ}\text{C}$  einwirken. Steinbrecht und Müller (1987) empfehlen bei der Anwendung einer Gefriersubstitution einen langsamen Temperaturanstieg, damit dem  $\text{OsO}_4$  genügend Zeit gegeben wird, um mit den Reaktionspartnern bei den höheren Temperaturen zu reagieren. Bei  $0^{\circ}\text{C}$  sollte das  $\text{OsO}_4$  entfernt werden, da es in Aceton gelöst bei Raumtemperatur nicht mehr stabil ist. In meiner Arbeit erfolgte das Spülen mit DMP/Aceton bei  $-30^{\circ}\text{C}$ . Da bei beiden Arten die Membranen ungenügend kontrastiert wurden, kann man davon ausgehen, daß sich das  $\text{OsO}_4$  nicht an die ungesättigten Membranlipide angelagert hat, und somit auch die Schnittkontrastierung mit Bleicitrat und Uranylacetat keine Wirkung zeigen konnte. Nach Vorversuchen mit unbefriedigenden Membrankontrastierungen wurde der Ansatz von Kaeser (1989) zur Gefriersubstitution an Pflanzengewebe von *Dahlia variabilis* und *Helianthus tuberosus* modifiziert, indem die Konzentrationen von Glutaraldehyd von 1,15 auf 2% und von  $\text{OsO}_4$  von 0,76 auf 1,5% erhöht wurden. Diese Veränderung erbrachte jedoch nicht den gewünschten Erfolg. Nach der Substitutionsmethode von Steinbrecht und Müller (1987) wurde Osmiumtetroxyd bei  $-60^{\circ}\text{C}$  zugegeben und wurde bei  $-30^{\circ}\text{C}$  wieder entfernt. Der Membrankontrast konnte dadurch etwas verbessert werden.

Mit den hier angewendeten Methoden ist es jedoch gelungen, Phycobilisomen in Makroalgen nachzuweisen. Phycobilisomen sind sehr empfindlich gegenüber konventionellen chemischen Fixierungsmethoden und nicht leicht abzubilden (Dodge, 1973; Gantt, 1986), was besonders für Makroalgen gilt, da aufgrund der Zellwände längere Fixierungszeiten angewandt werden müssen. Intakte Phycobilisomen an den Thylakoidmembranen konnten bisher hauptsächlich in Cyanobakterien und einzelligen Rotalgen dargestellt werden (Gantt und Conti, 1967). In Makroalgen ist die Abbildung nach chemischer Fixierung jedoch nicht einfach (Waaland et al., 1974; Van Eykelenburg, 1979; Pueschel und van der Meer, 1984; Mörschel und Rhiel, 1987; Rascio et al., 1991; Lange et al., 1990; Foltran et al., 1996; Talarico, 1996; Tsekos et al., 1996). Die Cryofixierung mit anschließender Gefriersubstitution bietet somit eine gute Möglichkeit, Phycobilisomen in Makroalgen darzustellen.

### **5.3 Veränderungen der Ultrastruktur, Photosyntheseaktivität und Pigmentkonzentrationen in *Palmaria decipiens***

*P. decipiens* zeigte nach UV-Bestrahlung Vesikelbildungen aus den Thylakoid- und Mitochondrienmembranen („inside-out vesicles“, siehe Publikationen 1 und 2). Membraneffekte, wie Unterbrechungen der äußeren Chloroplasten-Doppelmembran oder Auflösung der Grana- und Stromathylakoide, wurden bei verschiedenen UV-Bestrahlungsstärken auch in der einzelligen Grünalge *Micrasterias denticulata* sowie in den höheren Pflanzen *Pisum sativum* und *Beta vulgaris* beobachtet (Brandle et al., 1977; Bornmann et al., 1983; Meindl und Lütz, 1996; Lütz et al., 1997). Brandle et al. (1977) beobachteten sogar aus Thylakoidmembranen gebildete Vesikel im Stroma. In all diesen Untersuchungen wurde jedoch nicht gezeigt, daß die innere Oberfläche der Thylakoide zum Stroma ausgerichtet ist. In Zellen der Weißlichtkontrolle ist der Thylakoidinnenraum (Lumen) der Chloroplasten relativ klein im Verhältnis zum Stroma. Im Falle der „inside-out vesicles“ erscheint das Lumen hingegen stark ausgedehnt. Zudem kann kein Protonengradient an der Thylakoidmembran aufgebaut werden bzw. die Protonen werden in die verkehrte Richtung gepumpt, folglich müsste eine Alkalisierung im Inneren der Vesikel stattfinden und die Photosynthese somit gestört werden. Eine Depolarisierung des Membranpotentials, sowie Netto-Verluste von  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  und Unterschiede in der ATPase-Aktivität wurde bereits an UV-bestrahlten Zellmembranen (Doughty und Hope, 1973; Murphy, 1983; Gallo et al., 1989;) und Thylakoidmembranen (Iwanzik et al., 1983; Chow et al., 1992; Hideg und Vass, 1996) beobachtet. Da diese in der Literatur beschriebenen Veränderungen in der Ionenpermeabilität innerhalb weniger Stunden UV-Bestrahlung beobachtet werden können, könnten diese mit unseren Ultrastrukturerggebnissen zusammenhängen. Neben den Strukturveränderungen in den Chloroplasten von *P. decipiens* wurden auch eine veränderte Feinstruktur der Mitochondrien beobachtet. Ähnliche Effekte wurden in UV-bestrahlten höheren Pflanzen beschrieben (Lichtscheidl-Schultz, 1985; Santos et al., 1993). Diese UV-induzierten Veränderungen in der Membranstruktur von Mitochondrien könnten zu Störungen im ATP-Metabolismus führen, wie sie von Vosjan et al. (1990) an antarktischen Planktongemeinschaften beschrieben wurden. Aguilera et al. (1999) beschrieb jedoch bei *Palmaria palmata* keine starke Sensitivität der Respiration auf UV-Stress.

UV-Strahlung kann über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, wie Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ), Superoxidation-Radikale ( $O_2^{\cdot-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder Hydroxyl-Radikalen ( $OH^*$ ) die Lipidzusammensetzung in Pflanzenzellen verändern (Asada, 1994). Das Hauptangriffsziel der Lipidperoxidation sind die biologischen Membranen (Kochevar, 1990). So wurde in Phytoplanktonzellen und höheren Pflanzen beobachtet, daß der Anteil an mehrfach-ungesättigten Fettsäuren durch Lipidperoxidation abnimmt und somit das Verhältnis ungesättigter/gesättigter Fettsäuren verringert wird, was wiederum Auswirkungen auf die Membranstabilität haben muss (Tevini et al., 1981; Kramer et al., 1991; Goes et al., 1994; Malanga und Puntarulo, 1995). *P. decipiens* zeigt jedoch keine Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung nach 84 Stunden UV-Dauerbestrahlung, ist jedoch sehr reich an der mehrfach-ungesättigten Fettsäure 20:5 (n-3). Ein solch hoher Anteil von über 60 % dieser Fettsäure könnte mit dem Lebensraum in der Antarktis zusammenhängen, da die Pflanze Temperaturen um 0°C ausgesetzt ist, was normalerweise die Membranfluidität herabsetzt. Ob ein sehr hoher Anteil an mehrfach-ungesättigten Fettsäuren vor UV-induzierter Membranschädigung schützen kann, ist nicht geklärt. Pflanzenzellen sind durch verschiedene Enzymsysteme, wie Katalase (CAT), Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathion-Reduktase (GR), Ascorbat-Peroxidase (APO) und anderen Peroxidasen sowie durch bekannte hydro- und lipophile Antioxidantien (Ascorbat, Glutathion und  $\alpha$ -Tocopherol) vor Schädigung der Lipide, Proteine und Nukleinsäuren geschützt (Larson, 1988). In *P. decipiens* erhöht sich durch UV-Bestrahlung die Aktivität von GR und SOD signifikant (J. Aguilera, persönliche Mitteilung), was auf einen wirkungsvollen Schutz vor oxidativem Stress hinweist.

Die Photosynthese-Effizienz von *P. decipiens* wird durch UV-Bestrahlung erniedrigt, wobei der Photosynthese-Apparat nicht geschädigt wird, da sich die Art nach Überführung in PAR vom UV-Stress erholen kann. Der UV-A-Anteil führt zu einer geringeren Inhibition als UV-B. Ähnliche Ergebnisse wurden in *Palmaria palmata* beschrieben (Hanelt et al., 1997; Karsten et al., 2001). *P. decipiens* besitzt sogar die Fähigkeit, sich unter UV-Stress von der Photoinhibition zu erholen, was auf einen effizienten Anpassungs- und Akklimatisierungsprozess hinweist.

In unseren Untersuchungen konnten keine signifikanten Veränderungen in der Chlorophyll *a*-Konzentration gemessen werden. Kurzzeitige Konzentrationserhöhungen, wie in Abb. 10 (Publikation 1) und Abb. 14 dargestellt, wurden bereits in *P. decipiens* (Döhler, 1998), wie auch in anderen Makroalgen (Algarra und Niell, 1990; Döhler et al., 1995; Bischof et al., 2000) und Diatomeen (Buma et al., 1996; Döhler, 1996) beobachtet. Diese Ergebnisse deuten auf eine anfängliche kurzzeitliche Synthese von chl *a* und auf eine Akklimatisation aufgrund veränderter Bestrahlungsbedingungen hin.

Kurzzeitige Konzentrationsabnahmen von PE und PC, wie in Abb. 11 und 12 (Publikation 1) dargestellt, deuten auf eine Kurzzeitschädigung dieser Pigmente hin, bevor eine *de novo*-Synthese wieder startet. Da das Verhältnis von PE:PC im gesamten Versuchsablauf bei 25:1 war, kann man davon ausgehen, daß keine Abtrennung von PE-Monomeren stattgefunden hat (Daten nicht gezeigt). Bei Versuchen mit höheren UV-Bestrahlungsstärken und anderen Arten konnte jedoch gezeigt werden, daß die Phycobiline früher als chl *a* geschädigt werden

(Häder und Häder, 1989; Cordi et al., 1997) und daß die Phycobilisomen von der Peripherie in Richtung Zentrum abgebaut werden, d. h. zuerst wird PE und später PC abgetrennt (Fischer und Häder, 1992). Dies zeigten die Pigmentkonzentrationen bei *P. decipiens* nicht. Meine Daten der 77K-Fluoreszenzemissions-Spektroskopie deuten jedoch auf eine UV-induzierte Entkopplung des Energietransfers von PE zum PS II hin, die sich nach einer Erholung in der PAR-Bestrahlungsphase wieder stabilisierte. Während das Verhältnis der Fluoreszenzemission von PE:PS II innerhalb von 6 Stunden UV-Bestrahlung zunächst unverändert blieb, stieg die Fluoreszenzemission von PE im Verhältnis zu PS II nach 12 Stunden Exposition stark an (siehe Abb. 17). Auch hier zeigt sich, daß die Alge sehr gut an ihren Lebensraum angepasst ist.

#### **5.4 Effekte von UV-Strahlung auf die Ultrastruktur von *Palmaria decipiens*, *Palmaria palmata*, *Phycodrys austrogeorgica* und *Bangia atropurpurea***

Neben *P. decipiens* zeigten auch *Palmaria palmata*, *Phycodrys austrogeorgica* und *Bangia atropurpurea* UV-induzierte Membraneffekte in den Chloroplasten (siehe Publikation 2). *Ph. austrogeorgica* wies mit der Zerstörung der Chloroplastenhülle und einem Verteilen der Phycobilisomen im Cytoplasma eine stärkere Schädigung der Ultrastruktur auf als *P. decipiens*, *P. palmata* und *B. atropurpurea* (siehe Publikation 2). Dieser hohe Grad der Schädigung demonstriert die extreme Sensitivität der Chloroplasten dieser sublitoralen Art und bestätigt die Ergebnisse von Photosynthesemessungen an *Ph. austrogeorgica* nach UV-Bestrahlung (Bischof et al., 1998). In arktischen und antarktischen Makroalgen wurde bereits demonstriert, daß der Grad der UV- bzw. Starklicht-induzierten Inhibition der Photosynthese und deren Erholung mit der Tiefenzonierung der verschiedenen Arten korreliert (Bischof et al., 1998; Hanelt, 1998). In meinen Untersuchungen reagierte *Ph. austrogeorgica* mit einer stärkeren Inhibition der Photosynthese auf den UV-Stress als *P. decipiens*, diese Art konnte sich im Gegensatz zu *P. decipiens* nicht von der Photoinhibition erholen (siehe Abb. 7). Neben den vergleichenden Ergebnissen in der Ultrastruktur und in der Photosynthese-Effizienz deuten auch die Daten der MDA-Konzentrationen auf eine Korrelation mit der Tiefenzonierung hin. Hier zeigte sich schon bei einer UV-Bestrahlung von drei Stunden, daß *Ph. austrogeorgica* eine höhere Konzentration von MDA aufwies als *P. decipiens* (siehe Abb. 2), was auf stärkere Membranschädigung hinweist. Die extreme UV-Sensitivität von *Ph. austrogeorgica* könnte damit zusammenhängen, daß diese Art keine Fähigkeit besitzt, MAAs zu produzieren (Hoyer et al., 2001). MAAs wurden in der Literatur als wichtige UV-absorbierende Verbindungen in Rotalgen diskutiert, die vor allem im Wellenlängenbereich zwischen 310 und 360 nm absorbieren (Karentz et al., 1991). Unter den schwachen UV-Bestrahlungsstärken im Sublitoral kann diese Art überleben und sich reproduzieren. Bei einer Erhöhung des UV-Stresses könnte das Überleben von *Ph. austrogeorgica* in diesen Wassertiefen jedoch gefährdet sein. *Palmaria*-Arten besitzen im allgemeinen stets einen Pool an MAAs und die Fähigkeit, diesen unter UV-Stress zu erhöhen (Karsten et al., 1998). Von diesem Pool ausgehend, bildete *P. decipiens* schon nach 8 Stunden MAAs, vor allem P-334 (siehe Abb. 18). Noch höhere Konzentrationen wurden sogar in *Bangia atropurpurea* nachgewiesen (Karsten und West, 2000), die nach 72



Stunden UV-Bestrahlung mit einer Vesikulierung der Thylakoidstrukturen auf den UV-Stress reagierte.

Ein weiterer ultrastruktureller Aspekt sind UV-sensitive Proteinkristalle in *Ph. austrogeorgica*. Proteinkristalle werden neben Phycobilisomen in der Literatur als Proteinspeicher diskutiert, die unter Stickstoffmangel mobilisiert werden können (Pueschel, 1992). *Ph. austrogeorgica* bildet verschiedene Arten von Proteinkristallen aus. Zwei Typen wurden unter UV-Stress entweder zerstört oder abgebaut, so daß das Protein für Reparaturprozesse remobilisiert werden kann (siehe Publikation 2, Abb. 20-25). Proteine absorbieren stark im UV-B-Bereich und besitzen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm (Karentz, 1994). UV-Exposition kann somit zu erhöhtem Proteinabbau und einer *de novo*-Synthese führen, um UV-B-sensitive Proteine zu ersetzen (Cullen und Neale, 1994). Reparaturmechanismen für UV-geschädigte Membranen (siehe Publikation 2, Abb. 16) oder Elektronentransport-Komponenten erfordern verstärkte Enzymaktivitäten und somit einen erhöhten Stickstoffbedarf. So zeigen z. B. Photosyntheseproteine, wie Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) oder das PSII-Reaktionszentrum-Protein (D1) einen erhöhten turnover durch UV-Bestrahlung, was wiederum zu einer Erniedrigung der Photosyntheseaktivität führen kann (Aro et al., 1993). Desweiteren erhöht sich die Aktivität von antioxidativen Enzymsystemen unter UV-Stress (Strid et al., 1994; Jordan, 1996). UV-B-Strahlung kann sogar direkt das Stickstoff-Aufnahmesystem in Phytoplankton beeinträchtigen, was zu erniedrigten Aufnahmequoten von Nitrat und Ammonium führen kann (Döhler, 1992; Behrenfeld et al., 1995). Somit kann eine Funktion der Proteinkristalle in *Ph. austrogeorgica* die Stickstoff-Speicherung sein und als Puffer gegen den limitierenden Faktor der UV-induzierten Stickstoff-Limitierung angesehen werden.

### **5.5 Effekte von UV-Strahlung auf die Genexpression von *psbA* und *rbcl* in *Palmaria decipiens***

Regulierungsprozesse in der Photosynthese spielen eine wichtige Rolle in der Reaktion von Pflanzenzellen auf UV-Stress. So wurde die Genexpression der Photosynthese-Proteine Rubisco und D1 in Abhängigkeit von UV-Bestrahlung untersucht. Die Transkript-Level von *psbA* (D1-Protein) nahmen im Vergleich zur Weißlichtkontrolle am Anfang und am Ende eines Tagesgangs zu, während *rbcl*-Transkripte (Rubisco LSU) lediglich in den ersten beiden Stunden höher waren als die Weißlichtkontrolle und im weiteren Tagesverlauf die Transkription sogar unterdrückt wurde (siehe Publikation 3, Abb. 3). Die anfängliche Zunahme beider Transkripte unter UV-Bestrahlung sind als Antwort auf eine erhöhte Nachfrage der jeweiligen Proteine nach der nächtlichen Dunkelphase anzusehen. Vergleichbare diurnale Fluktuationen in der photosynthetischen Genexpression unter Licht-Dunkel-Rhythmen sind schon an Cyanobakterien und höheren Pflanzen beschrieben worden (Piechulla und Grussem, 1987; Colón-López und Sherman, 1998; Reddy et al., 2000). Da UV-Bestrahlung die Abbau- und Syntheserate des D1-Polypeptids erhöht (Greenberg et al., 1989), kann man davon ausgehen, daß die *psbA*-Transkriptrate zunimmt, um zerstörte D1-Proteine zu ersetzen. Eine solche Situation besteht nach 14 bis 16 Stunden UV-Bestrahlung im Tagesgang (siehe Publikation 3, Abb. 3). Da die mRNA-Transkripte für das *psbA*-Gen unter UV sehr stabil sind (Strid et al., 1994),

deuten diese Ergebnisse auf eine Regulation dieses Proteins auf der Ebene der Transkription hin. In *Pisum sativum* (Jordan et al., 1991; A.-H.-Mackerness et al., 1997; A.-H.-Mackerness et al., 1998; A.-H.-Mackerness et al., 1999) und *Arabidopsis thaliana* (Jordan et al., 1998; John et al., 2001), nehmen die *psbA*-Transkripte durch UV-Exposition ab, während sie in Cyanobakterien zunehmen (Campbell et al., 1998; Máté et al., 1998). Diese Zunahme wird durch die Synthese neuer Polypeptide als Ersatz für die geschädigten D1-Proteine erklärt. Bei *rbcl* hingegen findet nach anfänglicher Transkriptzunahme eine Unterdrückung des Transkriptlevels statt. Dies könnte damit zusammenhängen, daß keine zusätzlich synthetisierte Rubisco benötigt wird, der Transkriptionsapparat geschädigt ist oder die RNA-Stabilität durch UV-Strahlung herabgesetzt wird. Rubisco ist ein wichtiges Ziel der UV-Strahlung, da unter UV-Exposition die Quantität und Aktivität dieses Enzyms in höheren Pflanzen und Makroalgen abnimmt (Bischof et al., 2000).

Nach 8 Stunden im Langzeitversuch mit höheren UV-Bestrahlungsstärken ( $11 \text{ W m}^{-2}$  UV-A und  $1 \text{ W m}^{-2}$  UV-B) sind die *psbA*-Transkriptmengen höher als in der Weißlichtkontrolle. Nach 11 Tagen UV-Exposition steigt der Transkriptlevel sogar auf über 400% im Vergleich zur Weißlichtkontrolle an (siehe Publikation 3, Abb. 5). Auch hier kann man von einer erhöhten D1-Produktion aufgrund des UV-Stresses ausgehen, um die geschädigten Reaktionszentren zu reparieren. Die Regulation erfolgt somit auf transkriptioneller Ebene. Der *rbcl*-Transkriptlevel hingegen bleibt innerhalb der ersten 3 Tage unterhalb der Kontrollwerte, eventuell aufgrund einer Schädigung des Transkriptionsapparates, UV-zerstörter mRNA oder des fehlenden Bedarfs neu zu synthetisierender Rubisco. Danach steigt der Level zunächst auf Kontrollniveau an und erreicht nach 5 Tagen ein Maximum von 170 % der Kontrolle. Dies deutet auf eine Akklimatation oder Aktivierung von Reparaturmechanismen hin. In höheren Pflanzen nehmen *psbA*- und *rbcl*-Transkripte unter zusätzlicher UV-Exposition ab (Jordan et al., 1992), wobei *rbcl* stärker betroffen ist (A.-H.-Mackerness et al., 1997; Jordan et al., 1998; A.-H.-Mackerness et al., 1999). Diese Ergebnisse sind zunächst vergleichbar mit meinen Daten, da die *rbcl*-Transkripte im Langzeitversuch innerhalb der ersten drei Tage auf maximal 50 % der Kontrolle abnehmen. Auch in meinen Arbeiten zeigt sich, daß *psbA* weniger sensitiv auf UV-Exposition ist und schneller auf veränderte Bestrahlungsbedingungen reagieren kann. Das D1-Protein wird demgemäß während UV-Stress stärker neu synthetisiert als Rubisco und unterliegt somit einer stärkeren Turn-over-Rate. Diese Ergebnisse deuten eine UV-induzierte transkriptionelle Regulation des photosynthetischen Proteinmetabolismus an.

Hohe UV-Bestrahlungsstärken unterdrückten nach 1 Stunde den Transkriptlevel von *psbA* im Vergleich zum niedrigeren UV-Bestrahlungsansatz. Ähnlich verhält es sich bei *rbcl*. Bei *psbA* erfolgt jedoch innerhalb von 16 Stunden eine Anpassung und die Transkriptlevels übersteigen die der Kontrolle, während die *rbcl*-Transkripte stark unterdrückt bleiben. Hier zeigt sich, daß der *psbA*-Transkriptlevel aufgrund der Umsatzrate schneller und direkter auf den UV-Stress reagiert.

Im allgemeinen läßt sich sagen, daß die gegebenen UV-Bestrahlungsstärken nicht ausreichen, um die Transkription von *psbA* und *rbcl* in *P. decipiens* soweit zu schädigen, daß keine Erholung unter UV-Stress mehr möglich ist. Dies ist

ein weiterer Hinweis darauf, daß *P. decipiens* sehr gut an den Lebensraum des oberen Sublittorals angepaßt ist und relativ schnell auf erhöhte UV-Bestrahlungsstärken reagieren kann.

## 5.6 Schlussbetrachtungen

Mit dieser Arbeit sollte u. a. gezeigt werden, wie *Palmaria decipiens* auf UV-Bestrahlung reagiert. Als eine Art des oberen Sublittorals ist sie relativ unempfindlich gegenüber natürlichen UV-Bestrahlungsstärken, da sie kurzzeitige Effekte in der Ultrastruktur, Pigmentkonzentrationen, Photosynthese-Effizienz und Energieleitung innerhalb des Photosystems ausgleichen kann. Ein erhöhter Abbau von Photosynthese-Proteinen, wie Rubisco und D1 kann über die Transkription reguliert werden. Zudem kann sich die Alge mittels schneller Produktion von MAAs vor schädigender UV-Strahlung schützen.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die UV-Schäden in der Ultrastruktur bei eulittoralen Algen geringer sind als bei sublittoralen. Ein Vergleich verschiedener Parameter, wie Ultrastrukturveränderungen, MDA-Produktion und Photosynthese-Effizienz unter UV-Stress zwischen *Palmaria decipiens* und *Phycodrys austrogeorgica* zeigt, daß eine Korrelation zwischen der UV-Sensitivität und der Tiefenzonierung wahrscheinlich ist. Bei einer Erhöhung der antarktischen UV-Strahlung aufgrund eines weiteren Ozonabbaus, wäre *Phycodrys austrogeorgica* wahrscheinlich nicht in der Lage, in ihrer bisherigen Wachstumstiefe zu überleben, da diese Art keine Mechanismen zum Schutz vor schädigender UV-Strahlung, wie z. B. die Produktion von MAAs, besitzt.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse bieten verschiedene Aspekte, die in zukünftigen Arbeiten weiter verfolgt werden sollten. So erscheint es sinnvoll, Messungen antioxidativer Schutzsysteme in antarktischen Rotalgen zu untersuchen, um den Schutz vor Membranschädigungen oder der allgemeinen Schädigung der Photosynthese genauer betrachten und bewerten zu können. Es sollten weiterführende Versuche zur Genexpression unternommen werden, da hiermit Hinweise auf die Regulation von Proteinen erlangt werden könnten. An der hier geleisteten Pionierarbeit über Transkriptlevel in Rotalgen könnte somit angeschlossen werden, da die notwendigen Methoden neu entwickelt wurden. Aufschlussreich wären neben photosynthetischen Proteinen vor allem Untersuchungen über die Genexpression von antioxidativen und in der MAA-Synthese involvierten Enzymen, die sehr gut mit Ergebnissen auf der Proteinebene der jeweiligen Enzyme verknüpft werden könnten.

## 6 Literatur

A.-H.-Mackerness, S., Jordan, B.R., Thomas, B., 1999. Reactive oxygen species in the regulation of photosynthetic genes by ultraviolet-B radiation (UV-B: 280-320 nm) in green and etiolated buds of pea (*Pisum sativum* L.). J. Photochem. Photobiol., B: Biol. 48, 180-188.

A.-H.-Mackerness, S., Surplus, S.L., Jordan, B.R., Thomas, B., 1998. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthetic transcripts at different stages of leaf development and light levels in pea (*Pisum sativum* L.): Role of active oxygen species and antioxidant enzymes. Photochem. Photobiol. 68, 88-96.

A.-H.-Mackerness, S., Thomas, B., Jordan, B.R., 1997. The effect of supplementary ultraviolet-B radiation on mRNA transcripts, translation and stability of chloroplast proteins and pigment formation in *Pisum sativum* L. J. Exp. Bot. 48, 729-738.

Aguilera, J., Karsten, U., Lippert, H., Vögele, B., Philipp, E., Hanelt, D., Wiencke, C., 1999. Effects of solar radiation on growth, photosynthesis and respiration of marine macroalgae from the Arctic. Mar. Ecol. Prog. Ser. 191, 109-119.

Algarra, P., Niell, F.X., 1990. Short-term pigment response of *Corallina elongata* Ellis et Solander to light intensity. Aquat. Bot. 36, 127-138.

Aro, E.M., Virgin, I., Andersson, B., 1993. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. Biochim. Biophys. Acta 1143, 113-134.

Asada, K., 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer, C.H., Mullineaux, P.M. (Eds.), Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC Press, Boca Raton, pp. 77-104.

Babuka, S.J., Pueschel, C.M., 1998. A freeze-substitution ultrastructural study of the cytoskeleton of the red alga *Antithamnion kylinii* (Ceramiales). Phycologia 37, 251-258.

Bachmann, L., Mayer, E., 1987. Physics of water and ice: implications for cryofixation. In: Steinbrecht, R.A., Zierold, K. (Eds.), Cryotechniques in Biological Electron Microscopy. Springer-Verlag, Berlin, pp. 3-34.

Baker, K.S., Smith, R.C., 1982. Spectral irradiance penetration in natural waters. In: Calkins, J. (Ed.), *The Role of Solar Ultraviolet Radiation in Marine Ecosystems*. Plenum Press, New York, pp. 233-246.

Behrenfeld, M.J., Lean, D.R.S., Lee II, H., 1995. Ultraviolet-B radiation effects on inorganic nitrogen uptake by natural assemblages of oceanic plankton. *J. Phycol.* 31, 25-36.

Bischof, K., Hanelt, D., Tüg, H., Karsten, U., Brouwer, P.E.M., Wiencke, C., 1998. Acclimation of brown algal photosynthesis to ultraviolet radiation in Arctic coastal waters (Spitsbergen, Norway). *Polar Biol.* 20, 388-395.

Bischof, K., Hanelt, D., Wiencke, C., 1998. UV-radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. *Mar. Biol.* 131, 597-605.

Bischof, K., Hanelt, D., Wiencke, C., 2000. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. *Planta* 211, 555-562.

Bischof, K., Hanelt, D., Wiencke, C., 2002. UV-radiation and Arctic marine macroalgae. In: Hessen, D. (Ed.), *UV radiation and Arctic Ecosystems*. Springer, New York,

Bornmann, J.F., Evert, R.F., Mierzwa, R.J., 1983. The effect of UV-B and UV-C radiation on sugar beet leaves. *Protoplasma* 117, 7-16.

Bornmann, J.F., Evert, R.F., Mierzwa, R.J., Bornman, C.H., 1986. Fine structural effects of UV radiation on leaf tissue of *Beta vulgaris*. In: Worrest, R.C., Caldwell, M.M. (Eds.), *Stratospheric Ozone Reduction, Solar Ultraviolet Radiation and Plant Life*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 199-209.

Bornmann, J.F., Teramura, A.H., 1993. Effects of ultraviolet-B radiation on terrestrial plants. In: Young, A.R. (Ed.), *Environmental UV Photobiology*. Plenum Press, New York, pp. 427-471.

Bothwell, M.L., Sherbot, D.M.J., Pollock, C.M., 1994. Ecosystem response to solar ultraviolet-B radiation: influence of trophic level interactions. *Science* 256, 97-100.

Bourett, T.M., Czymbek, K.J., Howard, R.J., 1999. Ultrastructure of chloroplast protuberances in rice leaves preserved by high-pressure freezing. *Planta* 208,

472-479.

Brandle, J.R., Campbell, W.F., Sisson, W.B., Caldwell, M.M., 1977. Net photosynthesis, electron transport capacity, and ultrastructure of *Pisum sativum* L. exposed to ultraviolet-B radiation. *Plant Physiol.* 60, 165-169.

Bullock, G.R., 1984. The current status of fixation for electron microscopy: a review. *J. Microsc.* 133, 1-15.

Buma, A.G.J., Van Hannen, E.J., Roza, L., Veldhuis, M.J.W., Gieskes, W.W.C., 1995. Monitoring ultraviolet-B-induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluorescent thymine dimer detection. *J. Phycol.* 31, 314-321.

Buma, A.G.J., Zemmeling, H.J., Sjollema, K., Gieskes, W.W.C., 1996. UVB radiation modifies protein and photosynthetic pigment content, volume and ultrastructure of marine diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142, 47-54.

Caldwell, M.M., Camp, L.B., Warner, C.W., Flint, S.D., 1986. Action spectra and their key role in assessing biological consequences of solar UV-B radiation change. In: Worrest, R.G.&C.M.M. (Ed.), *Stratospheric Ozone Reduction, Solar Ultraviolet Radiation and Plant Life*. Springer, Berlin, pp. 87-111.

Campbell, D., Eriksson, M.-J., Öquist, G., Gustaffson, P., Clarke, A.K., 1998. The cyanobacterium *Synechococcus* resist UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 364-369.

Chow, W.S., Strid, A., Anderson, J.M., 1992. Short-term treatment of pea plants with supplementary Ultraviolet-B radiation: Recovery time-courses of some photosynthetic functions and components. In: Murata, N. (Ed.), *Research in Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 361-364.

Colón-López, M.S., Sherman, L.A., 1998. Transcriptional and translational regulation of photosystem I and II genes in light-dark- and continuous-light-grown cultures of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. *J. Bacteriol.* 180, 519-526.

Cordi, B., Depledge, M.H., Price, D.N., Salter, L.F., Donkin, M.E., 1997. Evaluation of chlorophyll fluorescence, in vivo spectrophotometric pigment absorption and ion leakage as biomarkers of UV-B exposure in marine macroalgae. *Mar. Biol.* 130, 41-49.

Cullen, J.J., Neale, P.J., 1994. Ultraviolet radiation, ozone depletion, and marine photosynthesis. *Photosynthesis Research* 39, 303-320.

Dahl, R., Staehelin, L.A., 1989. High-pressure freezing for the preservation of biological structure: theory and practice. *J. Electron Microsc. Tech.* 13, 165-174.

Dodge, J.D., 1973. *The Fine Structure of Algal Cells*. Academic Press, London.

Döhler, G., 1992. Impact of UV-B radiation on uptake of <sup>15</sup>N-ammonia and <sup>15</sup>N-nitrate by phytoplankton of the Wadden Sea. *Mar. Biol.* 112, 485-489.

Döhler, G., 1996. Effect of UV irradiance on utilization of inorganic nitrogen by the Antarctic diatom *Odontella weissflogii* (Janisch) Grunow. *Bot. Acta* 109, 35-42.

Döhler, G., 1998. Effect of UV radiation on pigments of the Antarctic macroalga *Leptosomia simplex* L. *Photosynthetica* 35, 473-476.

Döhler, G., Hagmeier, E., David, C., 1995. Effects of solar and artificial UV irradiation on pigments and assimilation of <sup>15</sup>N ammonium and <sup>15</sup>N nitrate by macroalgae. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.* 30, 179-187.

Doughty, C.J., Hope, A.B., 1973. Effects of ultraviolet radiation on the membranes of *Chara corallina*. *J. Membr. Biol.* 13, 185-198.

Dubochet, J., Sartori Blanc, N., 2001. The cell in absence of aggregation artifacts. *Micron* 32, 91-99.

Farman, J.C., Gardiner, B.G., Shanklin, J.D., 1985. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO<sub>x</sub>/NO<sub>x</sub> interaction. *Nature* 315, 207-210.

Fischer, M., Häder, D.-P., 1992. UV effects on photosynthesis and phycobiliprotein composition in the flagellate *Cyanophora paradoxa*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 101, 121-131.

Foltran, A., Maranzana, G., Rascio, N., Scarabel, L., Talarico, L., Andreoli, C., 1996. *Iridea cordata* from Antarctica: an ultrastructural, cytochemical and pigment study. *Botanica Mar.* 39, 533-541.

Franklin, L.A., Forster, R.M., 1997. The changing irradiance environment:

consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *Eur. J. Phycol.* 32, 207-232.

Franks, F., 1982. The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In: Franks, F. (Ed.), *Water and Aqueous Solutions at Subzero Temperatures*. Plenum Press, New York, pp. 215-338.

Frederick, J.E., Snell, H.E., 1988. Ultraviolet Radiation Levels During the Antarctic Spring. *Science* 241, 438-440.

Friedberg, E.C., 1985. *DNA Repair*. W.H. Freeman, New York.

Gallo, R.L., Kochevar, I.E., Granstein, R.D., 1989. Ultraviolet radiation induces a change in cell membrane potential *in vitro*: a possible signal for ultraviolet radiation induced alteration in cell activity. *Photochem. Photobiol.* 49, 655-662.

Gantt, E., 1986. Phycobilisomes. In: Staehelin, L.A., Arntzen, C.J. (Eds.), *Photosynthesis III. Photosynthetic Membranes and Light Harvesting Systems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 260-268.

Gantt, E., Conti, S.F., 1967. Phycobiliprotein localization in algae. Energy conversion by the photosynthetic apparatus: Report of symposium held. Brookhaven National Laboratory, Upton, NY, pp. 393-405.

Gieskes, W.W.C., Kraay, G.W., 1990. Transmission of Ultraviolet Light in the Weddel Sea: Report of the First Measurements Made in the Antarctic. *BIOMASS Newsletter* 12, 12-14.

Goes, J.I., Handa, N., Taguchi, S., Hama, T., 1994. Effect of UV-B radiation on the fatty acid composition of the marine phytoplankter *Tetraselmis sp.*: relationship to cellular pigments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 114, 259-274.

Graeve, M., Kattner, G., Wiencke, C., Karsten U., 2002. Fatty acid composition of Arctic and Antarctic macroalgae: indicator of phylogenetic and trophic relationships. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 231, 67-74

Greenberg, B.M., Gaba, V., Canaani, O., Malkin, S., Mattoo, A.K., Edelman, M., 1989. Separate photosensitizers mediate degradation of the 32 kDa-photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6617-6620.



Häder, D.-P., Häder, M.A., 1989. Effects of solar and artificial radiation on motility and pigmentation in *Cyanophora paradoxa*. Arch. Microbiol. 152, 453-457.

Häder, D.-P., Lebert, M., Colombetti, G., Figueroa, F., 2001. European light dosimeter network (ELDONET): 1998 data. Helgol. Mar. Res. 55, 35-44.

Hanawalt, P. C., Friedberg, E.C., Fox, C.F., 1978. DNA repair mechanisms. Academic Press, New York.

Hanelt, D., 1998. Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. Mar. Biol. 131, 361-369.

Hanelt, D., Jaramillo, J.M., Nultsch, W., Senger, S., Westermeier, R., 1994. Photoinhibition as a regulative mechanism of photosynthesis in marine algae of Antarctica. Ser. Cient. INACH 44, 67-77.

Hanelt, D., Wiencke, C., Nultsch, W., 1997. Influence of UV radiation on the photosynthesis of Arctic macroalgae in the field. J. Photochem. Photobiol., B: Biol. 38, 40-47.

Harm, W., 1980. Biological effects of ultraviolet radiation. Cambridge University Press, Cambridge.

Hayat, M. A., 1981. Fixation for Electron Microscopy. Academic Press, New York.

Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125, 189-198.

Hideg, E., Vass, I., 1996. UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. Plant Science 115, 251-260.

Hofmann, D.J., Harder, J.W., Rolf, S.R., Rosen, J.M., 1987. Balloon-borne observations of the development and vertical structure of the Antarctic ozone hole in 1986. Nature 326, 59-62.

Hoyer, K., Karsten, U., Sawall, T., Wiencke, C., 2001. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. Mar. Ecol. Prog. Ser.

211, 117-129.

Humbel, B., Marti, T., Müller, M., 1983. Improved structural preservation by combining freeze substitution and low temperature embedding. *Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl.* 16, 585-593.

Iwanzik, W., Tevini, M., Dohnt, G., Voss, M., Weiss, W., Gräber, P., Renger, G., 1983. Action of UV-B radiation on photosynthetic primary reactions in spinach chloroplasts. *Physiol. Plant.* 58, 401-407.

John, C.F., Morris, K., Jordan, B.R., Thomas, B., A.-H.-Mackerness, S., 2001. Ultraviolet-B exposure leads to up-regulation of senescence-associated genes in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 52, 1367-1373.

Jordan, B.R., 1996. The effects of UV-B radiation on plants: a molecular prospective. In: Callow, J.A. (Ed.), *Advances in Botanical Research*. Academic Press, New York, pp. 97-162.

Jordan, B.R., Chow, W.S., Strid, A., Anderson, J.M., 1991. Reduction in *cab* and *psb A* RNA transcripts in response to supplementary ultraviolet-B radiation. *FEBS Letters* 284, 5-8.

Jordan, B.R., He, J., Chow, W.S., Anderson, J.M., 1992. Changes in mRNA levels and polypeptide subunits of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase in response to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant, Cell and Environment* 15, 91-98.

Jordan, B.R., James, P.E., A.-H.-Mackerness, S., 1998. Factors affecting UV-B-induced changes in *Arabidopsis thaliana* L. gene expression: the role of development, protective pigments and the chloroplast signal. *Plant Cell Physiol.* 39, 769-778.

Kaesler, W., 1989. Freeze-substitution of plant tissues with a new medium containing dimethoxypropane. *J. Microsc.* 154, 273-278.

Kaesler, W., Koyro, H.-W., Moor, H., 1989. Cryofixation of plant tissues without pretreatment. *J. Microsc.* 154, 279-288.

Karentz, D., 1994. Ultraviolet tolerance mechanisms in antarctic marine organisms. In: Weiler, C.S., Penhale, P.A. (Eds.), *Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects*. American Geophysical Union,

Washington, D.C., pp. 93-110.

Karentz, D., Cleaver, J.E., Mitchell, D.L., 1991. Cell survival characteristics and molecular responses of antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *J. Phycol.* 27, 326-341.

Karentz, D., Lutze, L.H., 1990. Evaluation of biologically harmful ultraviolet radiation in Antarctica with a biological dosimeter designed for aquatic environments. *Limnol. Oceanogr.* 35, 549-561.

Karentz, D., Mc Euen, F.S., Land, M.C., Dunlap, W.C., 1991. Survey of mycosporine-like amino acid compounds in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Mar. Biol.* 108, 157-166.

Karsten, U., Bischof, K., Wiencke, C., 2001. Photosynthetic performance of Arctic macroalgae after transplantation from deep to shallow waters. *Oecologia* 127, 11-20.

Karsten, U., Sawall, T., Hanelt, D., Bischof, K., Figueroa, F.L., Flores-Moya, A., Wiencke, C., 1998. An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino-acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. *Botanica Mar.* 41, 443-453.

Karsten, U., West, J.A., 2000. Living in the intertidal zone - seasonal effects on heterosides and sun-screen compounds in the red alga *Bangia atropurpurea* (Bangiales). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 254, 221-234.

Kirst, G.O., Wiencke, C., 1995. Ecophysiology of polar algae. *J. Phycol.* 31, 181-199.

Klöser, H., Quartino, M.L., Wiencke, C., 1996. Distribution of macroalgae and macroalgal communities in gradients of physical conditions in Potter Cove, King George Island, Antarctica. *Hydrobiologia* 333, 1-17.

Kochevar, I.E., 1990. UV-induced protein alterations and lipid oxidation in erythrocyte membranes. *Photochem. Photobiol.* 52, 795-800.

Kramer, G.F., Norman, H.A., Krizek, D.T., Mirecki, R.M., 1991. Influence of UV-B radiation on polyamines, lipid peroxidation and membrane lipids in cucumber. *Phytochemistry* 30, 2101-2108.

Lamb, I.M., Zimmermann, M.H., 1998. Benthic marine algae of the Antarctic Peninsula. Antarctic Research Series 23, 200-203.

Lange, W., Wilhelm, C., Wehrmeyer, W., Mörschel, E., 1990. The supramolecular structure of photosystem II-phycoobilisome-complexes of *Porphyridium cruentum*. Bot. Acta 103, 250-257.

Larson, R.A., 1988. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry 27, 969-978.

Lichtscheidl-Schultz, I., 1985. Effects of UV-C and UV-B on cytomorphology and water permeability of inner epidermal cells of *Allium cepa*. Physiol. Plant. 63, 269-276.

Lin, C.H., Falk, R.H., Stocking, C.R., 1977. Rapid chemical dehydration of plant material for light and electron microscopy with 2,2-dimethoxypropane and 2,2-diethoxypropane. Am. J. Bot. 64, 602-605.

Lütz, C., Seidlitz, H.K., Meindl, U., 1997. Physiological and structural changes in the chloroplast of the green alga *Micrasterias denticulata* induced by UV-B simulation. Plant Ecology 128, 54-64.

Malanga, G., Calmanovici, G., Puntarulo, S., 1997. Oxidative damage to chloroplasts from *Chlorella vulgaris* exposed to ultraviolet-B radiation. Physiol. Plant. 101, 455-462.

Malanga, G., Puntarulo, S., 1995. Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. Physiol. Plant. 94, 672-679.

Máté, Z., Sass, L., Szekeres, M., Vass, I., Nagy, F., 1998. UV-B induced differential transcription of *psbA* genes encoding the D1 protein of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. J. Biol. Chem. 273, 17439-17444.

Meindl, U., Lütz, C., 1996. Effects of UV irradiation on cell development and ultrastructure of the green alga *Micrasterias*. J. Photochem. Photobiol., B: Biol. 36, 285-292.

Moor, H., 1987. Theory and practice of high pressure freezing. In: Steinbrecht, R.A., Zierold, K. (Eds.), Cryotechniques in Biological Electron Microscopy. Springer-Verlag, Berlin, pp. 177-191.

Mörschel, E., Rhiel, E., 1987. Phycobilisomes and thylakoids: The light-harvesting system of cyanobacteria and red algae. In: Harris, J.R., Horne, R.W. (Eds.), Membranous Structures. Academic Press, London, pp. 210-254.

Müller, R., Crutzen, P.J., Grooß J.U., Brühl, C., Russel, I.J.M., Gernandt, H., McKenna, D.S., Tuck, A.F., 1997. Severe chemical ozone loss in the Arctic during winter of 1995-96. *Nature* 389, 709-712.

Murphy, T.M., 1983. Membranes as targets of ultraviolet radiation. *Physiol. Plant.* 58, 381-388.

Nagl, W., 1981. Elektronenmikroskopische Laborpraxis. Springer-Verlag, Berlin.

Piechulla, B., Gruissem, W., 1987. Diurnal mRNA fluctuations of nuclear and plastid genes in developing tomato fruits. *EMBO J.* 6, 3593-3599.

Plattner, H., 1983. Die Entwässerung und Einbettung biologischer Objekte für die Elektronenmikroskopie. In: Schimmel, G., Vogell, W. (Eds.), Methodensammlung der Elektronenmikroskopie. WVG, Stuttgart,

Post, A., Larkum, A.W.D., 1993. UV-absorbing pigments, photosynthesis and UV exposure in Antarctica: comparison of terrestrial and marine algae. *Aquat. Bot.* 45, 231-243.

Pueschel, C.M., 1992. An ultrastructural survey of the diversity of crystalline, proteinaceous inclusions in red algal cells. *Phycologia* 31, 489-499.

Pueschel, C.M., van der Meer, J.P., 1984. Ultrastructural characterization of a pigment mutant of the red alga *Palmaria palmata*. *Can. J. Bot.* 62, 1101-1107.

Rascio, N., Mariani, P., Dalla Vecchia, F., Trevisan, R., 1991. The vegetative thallus of *Pterocladia capillacea* (Gelidiales, Rhodophyta) I. An ultrastructural and cytochemical study. *Botanica Mar.* 34, 177-185.

Reddy, M.S., Naithani, S., Tuli, R., Sane, P.V., 2000. Diurnal regulation of plastid genes in *Populus deltoides*. *Indian J. Biochem. Biophys.* 37, 453-458.

Ricker, R.W., 1987. Taxonomy and Biogeography of Macquarie Island Seaweeds. British Museum (Natural History), London.

- Santos, I., Almeida, J.M., Salema, R., 1993. Plants of *Zea mays* L. developed under enhanced UV-B radiation. I. Some ultrastructural and biochemical aspects. *J. Plant Physiol.* 141, 450-456.
- Smith, R.C., 1989. Ozone, middle ultraviolet radiation and the aquatic environment. *Photochem. Photobiol.* 50, 459-468.
- Smith, R.C., Baker, K.S., 1979. Penetration of UV-B and biologically effective dose-rates in natural waters. *Photochem. Photobiol.* 29, 311-323.
- Smith, R.C., Prezelin, B.B., Baker, K.S., Bidigare, R.R., Boucher, N.P., Coley, T., Karentz, D., MacIntyre, S., Matlick, H.A., Menzies, D., Ondrusek, M.E., Wan, Z., Waters, K.J., 1992. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* 255, 952-959.
- Smith, S.V., 1981. Marine macrophytes as a global carbon sink. *Science* 211, 838-840.
- Solomon, S., 1990. Progress towards a quantitative understanding of Antarctic ozone depletion. *Nature* 347, 347-354.
- Spurr, A.R., 1969. A Low-Viscosity Epoxy Resin Embedding Medium for Electron Microscopy. *J. Ultrastructure Research* 26, 31-43.
- Stein, J.R., 1973. Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge.
- Steinbrecht, R.A., Müller, M., 1987. Freeze-substitution and freeze-drying. In: Steinbrecht, R.A., Zierold, K. (Eds.), *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 149-172.
- Strid, A., Chow, W.S., Anderson, J.M., 1994. UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynthesis Research* 39, 475-489.
- Studer, D., Michel, M., Müller, M., 1989. High pressure freezing comes of age. *Scanning Microscopy Supplement* 3, 253-269.
- Talarico, L., 1996. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptive responses to light. *Sci. Mar.* 60, 205-222.

Tevini, M., Iwanzik, W., Thoma, U., 1981. Some effects of enhanced UV-B irradiation on the growth and composition of plants. *Planta* 153, 388-394.

Tsekos, I., Reiss, H.-D., Orfanidis, S., Orogas, N., 1996. Ultrastructure and supramolecular organization of photosynthetic membranes of some marine red algae. *New Phytol.* 133, 543-551.

Van Eykelenburg, C., 1979. The ultrastructure of *Spirulina platensis* in relation to temperature and light intensity. *Antonie van Leeuwenhoek - J. Microbiol. Serol.* 45, 369-390.

Vass, I., 1997. Adverse effects of UV-B light on the structure and function of the photosynthetic apparatus. In: Pessaraki, M. (Ed.), *Handbook of Photosynthesis*. Marcel Dekker, New York, pp. 931-949.

Vosjan, J.H., Döhler, G., Nieuwland, G., 1990. Effect of UV-B irradiance on the ATP content of microorganisms of the Weddell Sea (Antarctica). *Neth. J. Sea Res.* 25, 391-394.

Vosjan, J.H., van Balen, A.L.H.H., Zdanowski, M.K., 1996. Microbial biomass and light attenuation (PAR, UV-a, UV-b) in the Weddell Sea and the effect of UV-b on the ATP content of microbes. *Circumpolar J.* 11, 28-32.

Waaland, J.R., Waaland, S.D., Bates, G., 1974. Chloroplast structure and pigment composition in the red alga *Griffithsia pacifica*: regulation by light intensity. *J. Phycol.* 10, 193-199.

White, D.L., Andrews, S.B., Faller, J.W., Barnett, R.J., 1976. The chemical nature of osmium tetroxide fixation and staining of membranes by X-ray photoelectron spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 436, 577-592.

Wiencke, C., Clayton, M. N., 2002. *Biology of Antarctic seaweeds. Synopses of the Antarctic Benthos*. Koeltz, Königstein/Taunus.

Zielinski, K., 1990. Bottom macroalgae of the Admiralty Bay (King George Island, South Shetlands, Antarctica). *Polish Polar Research* 11, 95-131.

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt in erster Linie den beiden Betreuern meiner Arbeit, Prof. Dr. Christian Wiencke und Dr. habil. Dieter Hanelt sowie sämtlichen Mitgliedern der AG Makroalgen am Alfred-Wegener-Institut.

Ich möchte mich bei Dr. Linda Medlin für die großzügige Bereitstellung der Laboreinrichtungen und bei Kerstin Beyer für die Einführung in die Elektronenmikroskopie bedanken.

Zudem möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen am Alfred-Wegener-Institut bedanken, die mich über das Fachliche hinaus auch auf freundschaftliche Weise unterstützt haben: Angelika Dummermuth für die schöne Zeit im gemeinsamen Büro, Torsten Fischer und Uwe John für den Sound und diverse Sportaktivitäten, Kai Bischof für die unermüdliche Hilfe, Stefan Steffens für Rat und Tat in allen Lebenslagen, Thomas Mock und Alexander Lüdeking für lustige Stunden im Labor.

Zudem richtet sich mein persönlicher Dank an meine Eltern, die mich stets in vollem Umfang unterstützt haben.

Ein ganz spezieller Dank geht natürlich an Christina Kaufmann!

Die vorliegende Arbeit wurde am Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven durchgeführt und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.